

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

**Variabilidad fenotípica y genotípica de cepas de
Escherichia coli provenientes de crías de alpaca
(*Vicugna pacos*) con cuadros diarreicos y clínicamente
sanas**

TESIS

Para optar el grado de Magister en Biología Molecular

AUTOR

Luis Manuel Barrios Arpi

ASESOR

María E. Vásquez Cachay

Lima – Perú

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 134-UPG-FCB-2016

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las...9:30..... horas del día...30 de Junio..... en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

Dra.	Egma M. Mayta Huatuco	e integrado por
Mg.	Martha E. Valdivia Cuya	(Miembro)
Mg.	Débora E. Alvarado Iparraguirre	(Miembro)
Mg.	Edith F. Rodríguez Quispe	(Miembro)
Mg.	María E. Vásquez Cachay	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el Bachiller Don **LUIS MANUEL BARRIOS ARPI**.

Después de darse lectura al Expediente N° 134-UPG-FCB-16, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recibieron la exposición de la Tesis Titulada:

“Variabilidad fenotípica y genotípica de cepas de *Escherichia coli* provenientes de crías de alpaca (Vicugna pacos) con cuadros diarreicos y clínicamente sanas”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

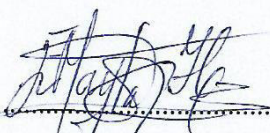
UNIDAD DE POSGRADO


Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de muy bueno con la nota de 18

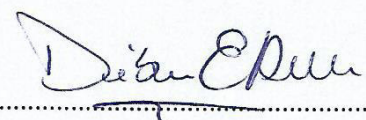
A continuación el Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en BIOLOGÍA MOLECULAR al Bachiller LOIS MANUEL BARRIOS ARPÍ

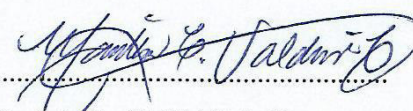
Siendo las 11:45 se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.


Se extiende la presente Acta en Lima, a los 30 días del mes de junio del año 2016.


Dra. Egma M. Mayta Huatuco
Profesor Principal a D.E.
PRESIDENTE


Mg. María E. Vásquez Cachay
Profesora Asociada a D.E.
ASESORA


Mg. Débora E. Alvarado Iparraguirre
Profesora Principal a D. E.
MIEMBRO


MG. Martha E. Valdivia Cuya
Profesora Principal a D.E.
MIEMBRO


Mg. Edith F. Rodríguez Quispe
Profesora Principal a T.C.
MIEMBRO

AGRADECIMIENTOS

A Dios por sobre todas las cosas, por haberme guiado en este camino hacia este logro en mi vida profesional.

A mi familia empezando con mis padres, personas admirables, que con su esfuerzo y sacrificio me apoyaron a que este logro sea culminado de la mejor manera, y a la vez haber apostado por mí en cada momento; a mi hermano, que a pesar de estar lejos siempre estuvo pendiente de mis logros dándome ese apoyo incondicional; y a mis sobrinos, cuñada, abuelita y familiares, de los cuales sentí el apoyo constante para la culminación de mis estudios.

Al amor de mi vida, Carina, quien fue mi fortaleza y me impulsó desde el inicio para desarrollar la maestría con éxito, sólo me quedan palabras de gratitud y admiración por la persona que eres y todo el apoyo que me diste en la realización de este trabajo.

A mis amigos y colegas José Luis Rodríguez, Juan Lucas, Siever Morales y Bernardo López, les doy las gracias por sus consejos y el apoyo brindado a fin de que pueda culminar mi maestría con éxito.

A mi asesora, la Mg. María Vásquez, gracias por sus consejos y las fuerzas dadas para terminar con este trabajo, sé que puedo contar con usted siempre, estimada colega y amiga.

Agradecimiento especial a la contribución de parte de los fondos provenientes del Proyecto N° 173-FINCyT-IB-2013, Lima-Perú para el financiamiento parcial del estudio de investigación.

Un especial agradecimiento a cada uno de mis profesores de la maestría, al jurado, de quienes aprendí mucho en cada paso que daba a lo largo de la maestría y en especial en las etapas finales del trabajo, agradeciendo en particular a los profesores Jaime Sánchez, Débora Alvarado y Armando Yarlequé, y así también a la Sra. Dorita.

Un agradecimiento especial al Instituto Nacional de Salud, considerando a los miembros del Laboratorio de Zoonosis virales, en particular al Dr. Ricardo López Ingunza por las facilidades brindadas para la realización de la tesis,, a la MV. Carina Mantari y a la Blga. Iris Pompa por el invaluable apoyo brindado; y así también, al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, en particular a mi asesor externo el Mg. Omar Cáceres Rey por sus consejos y observaciones en desarrollo del trabajo de investigación, y al Mg. Henri Baylón, quien se portó como un amigo a lo largo del desarrollo del trabajo, gracias por tus consejos y la confianza en mi persona.

Al Laboratorio de Patología Clínica y Biología Molecular de la FMV-UNMSM, gracias a la Dra. Olga Li por aconsejarme en cada momento, al Mg. Luis Hoyos, Blanquita y Carlitos quienes me apoyaron cada vez que los necesitaba, y a cada uno de los clínicos que apoyaron en el trabajo diario, gracias por la consideración.

A mi alma Mater, la UNMSM y la Facultad de Medicina Veterinaria en la cual me desempeñé como profesional y en la cual encontré un gran apoyo y contribuyeron en la realización de la tesis como los Dres. Lenin Maturrano y Raúl Rosadio, con palabras de aliento de buenos profesores y amigos como los Dres. Ampuero, Wilfredo Huanca y Juan Espinoza, y en especial al Dr. José Bustamante a quien considero un gran profesional y un gran amigo.

Y a cada una de las personas que contribuyeron a terminar esta etapa de mi vida, GRACIAS TOTALES!

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Visión general de patotipos de <i>Escherichia coli</i>	5
Tabla 2. Susceptibilidad antibiótica de aislados de <i>Escherichia coli</i> en crías de alpaca con y sin diarrea.....	68
Tabla 3. Susceptibilidad antibiótica de aislados de <i>Escherichia coli</i> en crías de alpaca con diarrea.....	68
Tabla 4. Susceptibilidad antibiótica de aislados de <i>Escherichia coli</i> en crías de alpaca sanas.....	69
Tabla 5. Resultados obtenidos mediante PFGE en aislados de crías de alpaca con cuadros diarreicos y clínicamente sanos.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiones geográficas donde las enfermedades bacterianas son emergentes o re-emergentes incluyendo la enfermedad producida por <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	9
Figura 2. Patrones de adherencia de <i>Escherichia coli</i> entérica. <i>Escherichia coli</i> requiere la adherencia al epitelio del hospedero.....	25
Figura 3. Distribución de los electrodos en el equipo CHEF utilizado en PFGE...	31
Figura 4. Diagrama esquematizado de los sistemas de gel de campos pulsados publicados hasta la actualidad.....	36
Figura 5. Placas con agar tripticasa soya (TSA) incubadas por 24 horas a 37°C donde se puede apreciar crecimiento bacteriano.....	66
Figura 6. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Escherichia coli</i> mostrando las reacciones positivas para indol, rojo metilo y vogues – proskauer, y reacción negativa a citrato.....	66
Figura 7. Muestra E76 del grupo de animales enfermos que muestra sensibilidad a cuatro antibióticos (fosfomicina, trimetoprim, gentamicina y ciprofloxacina) y resistencia a nitrofurantoína.....	67
Figura 8. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas genéticas entre los aislados de crías de alpaca clínicamente sanas. Carriles 1-3, 4-7 cepas de <i>E. coli</i> aisladas.....	71
Figura 9. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas genéticas entre los aislados de crías de alpacas clínicamente sanas y enfermas. Carriles 6-20, cepas de <i>E. coli</i> provenientes de animales clínicamente sanos; Carriles 31-42, cepas de <i>E. coli</i> provenientes de animales enfermos.....	72
Figura 10. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas genéticas en los aislados de crías de alpacas clínicamente sanas y enfermas. Carriles 21-30, cepas de <i>E. coli</i> provenientes de animales clínicamente sanos; Carriles 45-59, cepas de <i>E. coli</i> provenientes de animales enfermos.....	73
Figura 11. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas genéticas en los aislados de crías de alpacas clínicamente sanas y enfermas. Carriles 21-30, cepas de <i>E. coli</i> provenientes de animales clínicamente sanos; Carriles 45-59, cepas de <i>E. coli</i> provenientes de animales enfermos.....	74

Figura 12. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas genéticas en los aislados de crías de alpacas clínicamente sanas y enfermas. Carriles 17 y 27, cepas de *E. coli* post tratamiento con tiourea provenientes de animales clínicamente sanos.....74

Figura 13. Dendrograma generado por el Software GelCompar II, mostrando la relación genética entre los aislados de *Escherichia coli* provenientes de animales clínicamente sanos.....78

Figura 14. Dendrograma generado por el Software GelCompar II, mostrando la relación genética entre los aislados de *Escherichia coli* provenientes de animales enfermos.....79

Figura 15. Dendrograma generado por el Software GelCompar II, mostrando la relación genética entre los aislados de *Escherichia coli* provenientes de animales enfermos y clínicamente sanos.....80

ABREVIATURAS

AE:	<i>attachment and effacement</i>
<i>bfp:</i>	<i>bundle forming pili</i>
CFA:	<i>colonization factor antigen</i>
CH:	Colitis hemorrágica
DAEC:	<i>Escherichia coli</i> difusamente adherente
<i>eae:</i>	Gen codificador de intimina (<i>Escherichia coli attaching and effacing</i>)
EAEC:	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EcoR:	Enzima de restricción de <i>Escherichia coli</i>
EHEC:	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
Ehx:	Enterohemolisina
EIEC:	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC:	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica
Esp:	<i>Escherichia coli</i> secreted proteins
ETEC:	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
Gb3:	Receptor glicolípido globotriocilceramida
Gb4:	Receptor glicolípido globotetraocilceramida
Hly:	hemolisina
LEE:	<i>locus of enterocyte effacement</i>
LT:	Toxina termolábil
NTEC:	<i>Escherichia coli</i> necrotoxigénica
PFGE:	Electroforesis en campo pulsado
Pvull:	Enzima de restricción tipo 2 de <i>Proteus hauseri</i>
pO157:	Plásmido de serogrupo O157
ST:	Toxina termoestable
Stx:	Toxina Shiga
SUH:	Síndrome urémico hemolítico
XbaI:	Enzima de restricción tipo 1 de <i>Xantomonas badrii</i>

RESUMEN

El presente estudio tuvo por objetivo establecer la variabilidad fenotípica y genotípica de linajes de *Escherichia coli* aisladas de heces provenientes de crías de alpacas con cuadros entéricos y clínicamente sanas en base a la detección de patrones de restricción utilizando el método de Electroforesis de campos pulsados (PFGE). El estudio de muestreo se realizó en una comunidad campesina del departamento de Huancavelica, donde se seleccionaron 160 crías de alpaca, 90 con cuadros diarreicos y 70 clínicamente sanas, con edades comprendidas entre el mes y los dos meses de edad, a las cuales se les colectó con hisopo estéril una muestra de heces para el aislamiento e identificación de *Escherichia coli* en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, posteriormente se seleccionaron aleatoriamente 30 muestras de cada grupo para análisis de sensibilidad y resistencia antimicrobiana y para análisis de PFGE en el Laboratorio de Enteropatógenos y el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud, donde se procedió a la identificación de clonalidad de las cepas con el fin de obtener un patrón genético de bandas, evidenciando diferencias genotípicas en el dendrograma, permitiendo determinar interrelaciones de las diferentes cepas de *Escherichia coli*. Con respecto a los resultados de resistencia antimicrobiana se observó que casi la totalidad de las cepas fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos empleados, mostrando únicamente resistencia a la nitrofurantoína tanto en *E. coli* provenientes de crías de alpaca sanas como enfermas; y asimismo, se evidenció alta variabilidad en los patrones de PFGE entre los aislados de *E. coli* provenientes de crías de alpaca con cuadros diarreicos y las crías sanas, así como la evidencia de patrones de restricción idénticos entre crías sanas y enfermas, concluyendo la participación de *Escherichia coli* como parte de la flora normal de las alpacas, la alta variabilidad de cepas de *E. coli* provenientes de crías de alpacas y la alta resistencia a nitrofurantoína tanto en animales sanos como enfermos.

Palabras claves: *Escherichia coli*, cepas, diarrea, PFGE.

ABSTRACT

The aim of this study was determination of interrelations between different strains of *Escherichia coli* in faeces samples of alpaca with enteric disorders and clinically healthy based in detection of restriction patterns through method of pulsed gel field electrophoresis (PFGE). The sample study was conducted in rural community in the department of Huancavelica, where 160 baby alpaca, 90 with enteric disorders and 70 apparently healthy, aged between one month and two months of age, were collected with sterile swab a stool sample for the isolation and identification of *Escherichia coli* in the Microbiology Laboratory, Veterinary Medicine Faculty, San Marcos University, then it selected 30 samples of each group for analysis of antimicrobial sensitivity and resistance, and analysis of PFGE to be processed at the Laboratory of Enteric Pathogens and Molecular Biology of National Institute of Health, which shall be continuing viability of the strains and identification of clonality of strains in order to obtain a genetic pattern of bands, showing genotypic differences in dendrogram, should determine interrelationships different strains of *Escherichia coli*. It was evidenced difference in pattern of bands between the samples collected from baby alpacas with enteric disorders and apparently healthy. It concluded the participation of *Escherichia coli* as causal agent of diarrheas in this kind of animals. With respect to the results of antimicrobial resistance, It was observed that almost all strains were sensitive to majority of antibiotics, showing only resistance to nitrofurantoin in both groups; and also high variability in restriction patterns were observed among *E. coli* isolates from baby alpaca with diarrhea and clinically healthy, just as identical restriction patterns among healthy and sick alpacas, concluding *Escherichia coli* participation as part of the normal flora of the alpacas, the high variability of *E. coli* strains from baby alpacas and high resistance to nitrofurantoin both healthy and sick animals.

Key words: *Escherichia coli*, strains, diarrhea, PFGE.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES.....	2
1.1. Etiología.....	2
1.1.1 Clasificación.....	3
1.1.1.1. <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC).....	6
1.1.1.2. <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	7
1.2. Epidemiología.....	8
1.2.1. Incidencia y distribución geográfica.....	8
1.2.2. Reservorios y fuentes de infección.....	10
1.2.2.1. Camélidos sudamericanos.....	10
1.2.2.2. Otras especies.....	11
1.2.3. Medio ambiente.....	12
1.2.4. Temporada.....	13
1.2.5. Transmisión.....	13
1.3. Serotipos de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.....	14
1.3.1. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica O157:H7.....	15
1.3.2. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica no 157:H7.....	15
1.4. Factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.....	16
1.4.1. Toxina Shiga (<i>Stx</i>).....	16
1.4.2. Locus de borrado del enterocito (LEE).....	17
1.4.2.1. Intimina.....	18
1.4.3. Plásmido pO157.....	19
1.4.4. Enterohemolisina.....	19
1.4.5. Otros factores de virulencia.....	20
1.5. Fisiopatología de la enfermedad.....	20
1.6. Presentación clínica de la enfermedad.....	25
1.6.1. Animales.....	25
1.6.2. Humanos.....	26
1.7. Métodos de diagnóstico.....	27
1.7.1. Aislamiento microbiano.....	27
1.7.2. Actividad citotóxica.....	28

1.7.3. Técnicas bioquímicas.....	28
1.7.4. Electroforesis en campo pulsado (PFGE).....	29
1.7.4.1. Fundamento de la técnica.....	30
1.7.4.2. Enzimas de restricción.....	31
1.7.4.3. Tipos y variantes de PFGE.....	32
1.7.4.4. Aplicaciones del PFGE.....	36
1.7.5. Inmunoensayo.....	39
1.7.6. Métodos de reconocimiento con ácidos nucleicos.....	40
1.7.6.1. Hibridación con sondas genéticas.....	40
1.7.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	41
1.7.6.3. MLST (<i>Multi-locus sequence typing</i>)	43
1.8. Control y Prevención.....	43
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	45
2.1. Hipótesis.....	45
2.2. Objetivos.....	45
2.2.1. General.....	45
2.2.2. Específicos.....	45
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.1. Lugar de ejecución del estudio.....	46
3.2. Colección de muestras.....	46
3.3. Aislamiento microbiano.....	47
3.4. Identificación bioquímica.....	47
3.5. Pruebas de sensibilidad antibiótica.....	47
3.6. Detección de clonalidad por PFGE.....	48
3.6.1. Metodología de la técnica de PFGE.....	49
3.7. Materiales y reactivos.....	59
3.8. Análisis de datos.....	64
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	66
4.1. Cepas viables.....	66
4.2. Identificación bioquímica	66
4.3. Detección de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana.....	67
4.4. Identificación e interpretación de perfiles de PFGE.....	69
4.4.1. Análisis de geles de PFGE.....	70

4.4.2. Análisis de dendrogramas de similitud.....	75
DISCUSIÓN.....	81
CONCLUSIONES.....	95
RECOMENDACIONES.....	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
ANEXOS.....	118
Anexo 1. Base de datos de las crías de alpaca seleccionadas para el estudio.....	118
Anexo 2. Resultados de los halos de inhibición (mm) y antibiotipos (S, I o R) de cepas de <i>Escherichia coli</i> provenientes de heces de crías de alpaca clínicamente sanas. Cepas 1 - 15.....	119
Anexo 3. Resultados de los halos de inhibición (mm) y antibiotipos (S, I o R) de cepas de <i>Escherichia coli</i> provenientes de heces de crías de alpaca clínicamente sanas. Cepas 16 – 30.....	120
Anexo 4. Resultados de los halos de inhibición (mm) y antibiotipos (S, I o R) de cepas de <i>Escherichia coli</i> provenientes de heces de crías de alpaca con cuadros diarreicos. Cepas 1 – 15.....	121
Anexo 5. Resultados de los halos de inhibición (mm) y antibiotipos (S, I o R) de cepas de <i>Escherichia coli</i> provenientes de heces de crías de alpaca con cuadros diarreicos. Cepas 16 – 30.....	122
Anexo 6. Artículo científico.....	123

INTRODUCCIÓN

La elevada mortalidad de crías de alpaca, es uno de los principales factores que limitan el crecimiento poblacional y la productividad, siendo los cuadros entéricos y los procesos respiratorios las enfermedades más frecuentes producidas por agentes infecciosos en crías de alpacas, que en el caso de bacterias como *Escherichia coli* causa una diversidad de patologías desde infecciones entéricas restringidas hasta procesos septicémicos, que se explican por la presencia de una gama diversa de genes codificadores de factores de virulencia, los cuales sólo o combinados provocan un conjunto de signos clínicos en los animales afectados.

Existen diversos estudios que han permitido la detección de patotipos y factores de virulencia de *Escherichia coli* en distintas especies domésticas, incluyendo los camélidos sudamericanos; sin embargo, aún no existen estudios que determinen cuales son los grupos filogenéticos que estarían implicados en el desarrollo de cuadros entéricos en crías de alpacas, y tampoco, el flujo evolutivo que nos permitan determinar con precisión el origen y la evolución de las diferentes cepas de *Escherichia coli*.

El presente estudio de investigación está enfocado a la determinación de variabilidad fenotípica y genética de cepas de *Escherichia coli* para así determinar las relaciones entre los linajes y el grado de parentesco entre cada uno de los aislados de *E. coli* en animales con cuadros diarreicos y clínicamente sanos para así poder evidenciar la posible divergencia existente entre cepas de la bacteria en alpacas, lo cual sería de gran impacto en cuestiones de manejo, control y prevención, ya que es posible la existencia de una misma cepa en diferentes zonas donde estos animales estén destinados a la producción, y eso conllevaría a reducir las malas prácticas de manejo y sanidad, que permitan que cepa (s) hayan divergido entre diferentes localizaciones. Los resultados obtenidos indicarían una alta diversidad genética baja variabilidad fenotípica entre cepas de *Escherichia coli* que se encuentran en animales con cuadros diarreicos y clínicamente sanos.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

1.1. Etiología

Escherichia coli es una enterobacteria que fue descubierta en 1885 por Theodor Escherich cuya denominación inicial fue *Bacterium coli commune* para indicar su aparición universal en el intestino de individuos sanos (Vadillo *et al.*, 2002). Esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo el principal miembro de la microbiota bacteriana del ambiente y en las heces de especies de aves y mamíferos tales como pollos, porcinos y vacunos (Higgins *et al.*, 2007).

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no esporulado, habitualmente dotado de flagelos, y a menudo de fimbrias (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004). Asimismo, estos organismos entéricos son oxidasa negativos, reducen los nitratos a nitritos, y fermentan glucosa y lactosa, y asimismo crecen de manera favorable en el medio Agar MacConkey (Quinn y Markey, 2005).

La mayoría de las *E. coli* son inocuas y presumiblemente ayudan a mantener la fisiología saludable del hospedador (Kaper *et al.*, 2004), sin embargo, una pequeña proporción de estos agentes son causas importantes de enfermedades a nivel mundial tanto como agente primario o bien como agente secundario (Quinn y Markey, 2005).

Las cepas patogénicas de *E. coli* han desarrollado la capacidad para causar una amplia variedad de enfermedades en humanos y animales (Nataro y Kaper, 1998), debido a la adquisición de genes de virulencia móviles localizados en islas de patogenicidad que se encuentran localizados en los bacteriófagos integrados o en el plásmido, siendo mayor la susceptibilidad en animales jóvenes y lactantes. Se ha demostrado que la colonización de *E. coli* en el tracto intestinal en mamíferos, ocurre normalmente pocas horas después del parto, donde adquieren la flora intestinal de sus madres o de fuentes ambientales (Quinn y Markey, 2005). Asimismo, se sabe que la bacteria es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua, alimento y otras fuentes medio ambientales; y su

aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente, porque es abundante en las heces humanas y de animales (Bell y Kyriakides, 1998; Vadillo *et al.*, 2002).

1.1.1. Clasificación

Las cepas de *E. coli* están clasificadas en tres grupos distintos tales como cepas comensales, cepas patogénicas intestinales y cepas patogénicas extra intestinales (Lyhs *et al.*, 2012). *E. coli* normalmente habita el intestino de los animales domésticos y el humano sin causar enfermedad; sin embargo, algunas veces causa enfermedades con múltiples complicaciones.

Han sido descritos seis patotipos de las *E. coli* patogénicas intestinales: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC) (Hussain, 2015). Esta clasificación está basada en las diferencias de los factores de virulencia, manifestaciones clínicas, mecanismos de patogenicidad y serología (Quinn y Markey, 2005) (Tabla 1).

E. coli productora de toxina *Shiga* (STEC) se caracteriza por la producción de toxinas *Shiga* (Stx1, Stx2 y sus variantes) (Quinn y Markey, 2005); y *E. coli* enterohemorrágica es un tipo de ésta, la misma que incluye una connotación clínica en la que no está implicada la STEC. La EHEC es aislada a partir de casos de diarrea hemorrágica por consumo, principalmente, de alimentos de origen animal contaminado, el cual ha ido tomando mucha importancia en los últimos años, recomendándose en muchos laboratorios de referencia, la vigilancia epidemiológica de este patógeno (Huguet *et al.*, 2002). El serotipo clásico *E. coli* O157:H7, es considerado el serotipo de mayor importancia en salud pública a nivel mundial (Robinson *et al.*, 2006).

E. coli enterotoxigénicas (ETEC) son capaces de producir dos tipos de enterotoxinas bien definidas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST) (Levine, 1987). Las cepas de ETEC han sido reconocidas por ser causantes de

diarrea en lechones e infección letal en animales recién nacidos (Alexander, 1994).

ETEC y STEC, esta última también llamada *E. coli* productora de verotoxina, tiende a causar diarrea postdestete. Esta enfermedad es usualmente el principal problema infeccioso en granjas a gran escala y causa pérdidas significativas a nivel mundial (Osek, 2000; Vu-Khac *et al.*, 2006). Los tipos de *E. coli* patógenos en porcinos involucrados en la diarrea post destete típicamente pertenecen a los serogrupos O8, O138, O139, O141, O149, y O157.

E. coli enteropatogénico (EPEC) es causa importante de diarrea en humanos y animales (Beutin *et al.*, 1994). En principio, se definió a esta cepa en base a los serotipos O y H, sin embargo en la actualidad, se define en base a características patogénicas (Nataro y Kaper, 1998). EPEC y EHEC, a diferencia de las otras cepas patógenas de *E. coli*, producen lesiones histopatológicas únicas sobre las células epiteliales intestinales, llamadas lesiones de adhesión y borrado (AE: *Ataching and effacing*). Asimismo, estas cepas son mediadas por una isla de patogenicidad llamada *Locus* del borrado del enterocito (LEE: *Locus of Enterocyte Effacement*) (Alfredo *et al.*, 2005).

Las cepas EIEC son conocidas por causar enfermedades en seres humanos con un cuadro sintomatológico muy similar a las producidas por *Shigella* sp., pero difiere de las demás cepas de *E. coli* en su capacidad de invadir y multiplicarse dentro de las células epiteliales colónicas (Wasteson, 2001).

E. coli necrotoxigénica (NTEC), similar a ETEC, puede elaborar dos tipos de factor necrotizante citotóxico (CNF1 y CNF2) (Orden *et al.*, 1999; Staats *et al.*, 2003). ETEC, EPEC y EIEC han sido implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) causando gastroenteritis en seres humanos (Quinn y Markey, 2005).

Tabla 1. Visión general de patotipos de *Escherichia coli* (Croxen *et al.*) (Versión modificada En: Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*, 2013)

Patotipo	Hospedero (s)	Sitio de colonización	Enfermedad (es)	Fuente (s)/Reservorio (s) conocido(s) de contaminación	Adhesión	Marcadores genéticos
tEPEC	Niños < 5 años,	Intestino delgado	Diarrea acuosa	Humanos	Adhesión y borrado	<i>eae</i> ⁺ , <i>bfp</i> ⁺ , <i>stx</i>
aEPEC	adultos en alta dosis		profusa	Humanos, animales		<i>eae</i> ⁺ , <i>stx</i>
STEC	Adultos, niños	Íleon distal, colon	Diarrea acuosa, Colitis hemorrágica, HUS	Humanos, animales, alimentos, agua	Adhesión y borrado ^a	<i>eae</i> ⁺ , <i>stx</i> ⁺
EIEC/ <i>Shigella</i>	Niños < 5 años, viajeros, Inmunocomprometidos	Colon	Shigelosis/Disentería bacilar, HUS	Humanos, animales, alimentos, agua	NA (invasiva)	<i>ipaH</i> ⁺ , <i>ial</i> ⁺ , <i>stx</i> ⁺ (<i>S.dysenteriae</i>)
EAEC	Adultos	Intestino delgado y/o colon	Diarrea del viajero, HUS	Alimentos, ocasionalmente	Formaciones	CFs, LT, ST
	Niños		Diarrea persistente	adultos	apiladas y/o	
	Inmunocomprometidos		Diarrea persistente		invasivas	
ETEC	Niños < 5 años, viajeros	Intestino delgado	Diarrea acuosa	Alimentos, agua, humanos, Animales	Factores de colonización	Marcadores no uniformes
DAEC	Niños (más severo de 18 meses a 5 años), adultos	Intestino (no caracterizado)	Diarrea acuosa persistente en niños, se especuló a contribuir en la Enfermedad de Crohn	Desconocido	Difusa adherente y/o invasiva	No caracterizado
AIEC	Adultos, niños	Intestino delgado	Enfermedad de Crohn Desconocido		NA (invasiva)	

NA, no aplicable; a: Solo para STEC positivo a LEE, no para STEC negativo a LEE.

1.1.1.1. *Escherichia coli* productora de toxina *Shiga*

En los años 70' se demostró que ciertas cepas de *E. coli* producían una toxina llamada inicialmente Verotoxina (VT), a causa de su actividad inhibitoria sobre células Vero. Posteriormente cambió su denominación a toxina tipo *Shiga* (SLT: *Shiga like toxin*) (Melton-Celsa y O'Brien, 1998), siendo la actual nomenclatura es toxina *Shiga* (Stx) (Tarr y Neill, 2001), debido a que esta citotoxina es muy similar en cuanto a estructura, función y antigenicidad a la Stx producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Karpman *et al.*, 1997).

Los términos *E. coli* productora de toxina *Shiga* (STEC) o *E. coli* verotoxigénica (VTEC) son equivalentes y se usan dentro de la comunidad científica para hacer referencia a las cepas de *E. coli* que producen Stx1, Stx2 y sus variantes, o ambos (Armstrong *et al.*, 1996; Alfredo *et al.*, 2005).

Estudios posteriores han demostrado el papel de las toxinas *Shiga* en el cuadro clínico de la infección por STEC, y el rol que cumplen los rumiantes en la transmisión de la enfermedad (Griffin y Tauxe, 1991). Además, muchas cepas pertenecientes a STEC han sido halladas comúnmente en un amplio rango de animales de granja y silvestres, donde en la mayoría de ellos no parece causar enfermedad aparente (Caprioli *et al.*, 2005).

La toxina *Shiga* es considerada el principal factor de virulencia, siendo la característica que define a EHEC. La familia Stx contiene dos grupos principales, sin reacción cruzada inmunológica llamados Stx1 y Stx2. Una sola cepa EHEC puede expresar solo Stx1, solo Stx2 o ambas toxinas. Mientras que Stx1 está altamente conservado, existen diferencias entre secuencias de Stx2. Estas variaciones encontradas son designadas como: Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2e, entre otras; sin embargo, las estructuras básicas se mantienen conservadas a través de todos los miembros de la familia Stx.

Se ha demostrado que Stx puede causar acumulación de fluidos y lesiones histopatológicas en riñones, intestino, miocardio y páncreas (O'Loughlin y Robins-Browne, 2001). Es probable, que la capacidad de EHEC para producir lesiones A/E es suficiente para producir diarrea sanguinolenta pero Stx es fundamental para el desarrollo de diarrea sanguinolenta y colitis hemorrágica (Nataro y Kaper, 1998).

Existen más de 100 serotipos diferentes de *E. coli* que han sido reportados por producir la toxina *Shiga*. Solamente aquellas que han sido asociadas clínicamente con SUH (Síndrome urémico hemolítico) son designadas como EHEC (Armstrong *et al.*, 1996). Algunas cepas pertenecientes a STEC son responsables de la enfermedad de los edemas en cerdos (EDEC) y otro grupo asociado a la presentación de disentería a terneros jóvenes.

1.1.1.2. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Las cepas de EHEC han sido aisladas de casos de diarrea hemorrágica por consumo mayoritario de alimentos de origen animal contaminado, por lo cual, ha cobrado mucha importancia en los últimos años (Huguet *et al.*, 2002). Las cepas de *E. coli* enterohemorrágica se definen como aquellas *E. coli* que tienen la capacidad de producir SUH en humanos (Quinn y Markey, 2005), poseer un gen que codifica la potente toxina *Shiga* (Stx1, Stx2 y sus variantes, o ambos) (Quinn y Markey, 2005), causar lesiones de adhesión íntima y borrado del enterocito (Nataro y Kaper, 1998), y presentar un plásmido pO157 (Schmidt y Karch, 1996).

La mayor parte de las investigaciones sobre factores patogénicos de EHEC se han centralizado en el estudio del gen *stx*, que se encuentra codificado en un bacteriófago insertado en el cromosoma. Asimismo, otros factores potenciales adicionales de virulencia se codifican a nivel cromosomal y en un plásmido de 60 MDa encontrado en todas las cepas del serotipo O157:H7. El serogrupo O157 (principalmente el serotipo antes mencionado), es la mayor preocupación de salud pública a nivel mundial (Robinson *et al.*, 2006) y es reconocido como un agente

importante de enfermedades humanas transmitidas por alimentos (Armstrong *et al.*, 1996).

El hallazgo histopatológico clásico en intestino incluye hemorragia y edema de la lámina propia intestinal. El edema y hemorragia a nivel de la submucosa en el colon ascendente y transversal son también hallazgos característicos (Percival *et al.*, 2014). Sin embargo, este tipo de lesiones no se han observado en muestras clínicas, pero se piensa que estas lesiones no son observadas debido a lo avanzado de la enfermedad al momento de la recolección de la muestra, por tanto, la lesión es solo evidenciada en etapas tempranas (Nataro y Kaper, 1998; Gyles *et al.*, 2010).

1.2. Epidemiología

1.2.1. Incidencia y distribución geográfica

Las infecciones por EHEC ocurren mundialmente, pero es en los países industrializados donde se reportan la mayoría de los casos esporádicos y brotes como en Estados Unidos y Canadá (Fig. 1). En Estados Unidos, más del 80% de infecciones por STEC son debido a cepas de *E. coli* O157 (Ochoa *et al.*, 2008), principalmente involucrado el serotipo *E. coli* O157:H7, lo que representa aproximadamente de 3 a 4.6 casos por 100,000 personas cada año (CDC, 2005), siendo el agente patógeno más frecuentemente aislado de muestras de heces con sangre de humanos (Slutsker *et al.*, 1997).

En el caso de países de Europa, como España, EHEC O157:H7 ha provocado varios brotes, produciéndose el mayor de éstos en el año 2000, donde resultaron afectadas 158 personas, siendo en su mayoría niños menores de 5 años (Vadillo *et al.*, 2002).

En otros países como Japón (Kobayashi *et al.*, 2001), Corea (Jo *et al.*, 2004), República Popular China (Zheng *et al.*, 2005), Italia, Argentina (Meichtri *et al.*, 2004), Chile, Uruguay, Venezuela y Brasil (Irino *et al.*, 2005), se ha reportado la presencia

de EHEC O157 en ganado vacuno y humanos. En Botswana, se encontraron en productos de carne; y en Sudáfrica ha sido aislado en ganado vacuno relacionado con diarrea en seres humanos.

En nuestro país, en el 2001, se aisló *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 de una lactante de 11 meses de edad. La menor presentaba un cuadro de diarrea disentérica, la presencia de toxina *Shiga* tipo 2 y el gen *eae*, y la actividad hemolítica y no fermentadora de sorbitol (Huapaya *et al.*, 2001; Huguet *et al.*, 2002). Posteriormente, un estudio realizado en la capital, en muestras que fueron tomadas de carne, queso y vegetales, se reportó una prevalencia de 12.3% de *Escherichia coli* O157:H7 (Mora *et al.*, 2007).

Es realmente preocupante el alto potencial para los brotes multinacionales de enfermedades transmitidas por alimentos debido al comercio internacional de comidas contaminadas con *E. coli* enterohemorrágica. En relación al concepto de brote, éste es definido como 2 o más casos de infecciones de STEC con una exposición epidemiológica común; y un caso es usualmente definido como una identificación de STEC mediante el cultivo de muestras de heces, presencia de colitis hemorrágica o SUH (Rangel *et al.*, 2005).

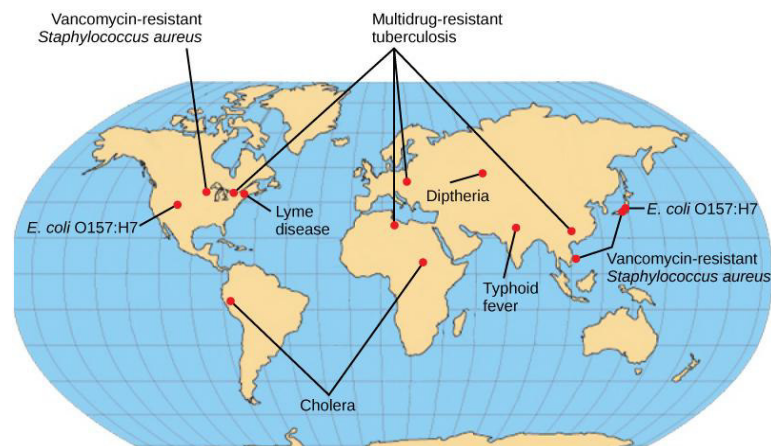


Figura 1. Regiones geográficas donde las enfermedades bacterianas son emergentes o re-emergentes incluyendo la enfermedad producida por *Escherichia coli* O157:H7 (credit: modification of work by NIH)

1.2.2. Reservorios y fuentes de infección

EHEC está presente en el tracto intestinal y es excretado en las heces de una gran variedad de especies animales, principalmente los rumiantes, dentro de los cuales, los bovinos son considerados como los principales reservorios; y se transmite a los humanos a través del contacto con las heces de los animales infectados o su ambiente, principalmente para EHEC y EPEC (Beutin *et al.*, 1994).

1.2.2.1. Camélidos sudamericanos

Las enfermedades infecciosas son las principales causas de mortalidad en las crías, siendo su presentación asociada a fallas en la transferencia de inmunidad pasiva a las crías de través del calostro (Garmendia *et al.*, 1987). Las crías de alpacas nacen hipogamaglobulinémicas debido a la placentación epiteliocorial difusa de los camélidos. El calostro de las alpacas contiene principalmente inmunoglobulina G (Ig G) y la eficacia de su absorción disminuye hasta las 24 horas de vida. Las concentraciones de Ig G disminuyen rápidamente después de la ingestión de calostro en crías, alcanzan un pico entre las 24 y 48 horas de vida y empiezan a declinar de forma continua (Wernery, 2001).

En un centro de investigación de camélidos en Perú, la mortalidad en el periodo predestete durante un tiempo de 3 años fue del 12% (Bustinza *et al.*, 1988). Las pérdidas de crías de alpacas dentro de los primeros tres o cuatro meses de vida alcanzan cifras elevadas que en algunos casos pueden superar el 50% de los animales nacidos (Fernández-Baca, 2005). Según Bustinza (2001), la mortalidad puede alcanzar hasta el 80% de crías de alpacas. La elevada mortalidad de las crías de alpacas es uno de los principales factores que limitan su productividad en zonas altoandinas. Las principales causas de mortalidad en estos animales son las enfermedades infecciosas y el manejo inadecuado, puesto que las enfermedades más frecuentes en los neonatos se asocian a fallos en la transferencia de la inmunidad maternal (Ameghino y De Martini, 1991).

En un estudio reciente, realizado en 200 muestras diarreicas de alpacas menores de un mes de edad se evidenció la coexistencia de otros agentes parasitarios involucrados en el complejo entérico neonatal tales como *Cryptosporidium* sp, rotavirus y *Eimeria* sp (Rosadio *et al.*, 2012). Asimismo, se ha reportado mediante inmunofluorescencia indirecta y PCR cerca del 50% de muestras positivas a *Giardia* sp. (Gómez-Couzo *et al.*, 2011), lo que podría confirmar a este agente parasitario como uno de los principales agentes potencialmente productores de diarrea en alpacas neonatas y jóvenes (Cebra *et al.*, 2003).

En alpacas no se ha podido identificar aún la presencia de *Escherichia coli* O157; sin embargo, se ha identificado la presencia los genes *eae* y *stx*, siendo esta especie un posible reservorio de *Escherichia coli* enterohemorrágica, presentando mayormente el gen de la toxina Stx2 conocida de ser causante de diarreas severas en humanos (Silvera *et al.*, 2012; Rímac, 2015).

1.2.2.2. Otras especies

a) Bovinos

El ganado vacuno constituye el principal reservorio de EHEC (Vadillo *et al.*, 2002) y son excretados en sus heces. Muchos de los brotes ligados a la carne y productos de la carne y a STEC son prevalentes en ganado vacuno y entre el 70 y 100% de bovinos son positivos a *stx* (Berry y Miller, 2005). La excreción de *E. coli* O157:H7 es temporal, en periodos de 0 a 3 meses; y depende de muchos factores tales como la dieta, cantidad de agua contaminada consumida, competencia de la flora microbiana, cepa de *E. coli*, edad, condiciones de la granja y el periodo del año (Sánchez *et al.*, 2002).

A diferencia de los animales adultos, los terneros jóvenes y animales recién destetados presentan mayor número de bacterias en las heces y su excreción fecal se da por periodos más prolongados (Cray y Moon, 1995). El aumento de la prevalencia se da en el ganado vacuno en crecimiento (3-18 meses de edad), en comparación con los animales adultos, debido principalmente a que presenta una

flora gastrointestinal poco estable (Besser *et al.*, 1997), así como flora microbiana en el tracto gastrointestinal, diferencias del desarrollo ruminal, y cambios en el manejo alimenticio. El incremento estacional de la excreción de *E. coli* O157:H7 en vacunos sería debido a diferencias en la flora microbiana del tracto gastrointestinal durante el verano, por cambios en la dieta o relacionado a condiciones que conducen a la multiplicación de la bacteria en el medio ambiente (Ferens y Hovde, 2011).

b) Ovejas

Diversos serotipos han sido aislados de estos animales tanto en sus heces (Ferens y Hovde, 2011) como en su carcasa, indicando que esta especie puede ser un vehículo para la cadena alimenticia humana (Chapman *et al.*, 2001; Fegan y Desmarchelier, 1999).

c) Especies silvestres

Cepas de *E. coli* han sido detectadas en especies silvestres que habitan cerca de los ambientes del ganado donde se incluyen las ratas (Cizek *et al.*, 1999), aves silvestres (Nielsen *et al.*, 2002), zarigüeyas (Renter *et al.*, 2003), mapaches (Shere *et al.*, 1998) y venados (Keene *et al.*, 1997; Sargeant *et al.*, 1999). En venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) se sabe que pueden ser colonizados, y excretar EHEC O157:H7 en forma experimental y en estudios de campo (Fisher *et al.*, 2001), además, estos animales son reconocidos como reservorios para la diseminación de estos organismos en el medio ambiente (Ferens y Hovde, 2011). Los animales silvestres que son capaces de excretar *E. coli* O157:H7 en sus heces pueden proporcionar una fuente directa o indirecta de la contaminación a cualquier ser humano o especies domésticas que tengan una fuente de agua común en su medio, alimento u otras fuentes medio ambientales localizadas en las ganaderías o su entorno (Ferens y Hovde, 2011).

1.2.3. Medio ambiente

El medio ambiente cumple un papel importante en la epidemiología de la enfermedad, mencionando que tanto las heces como el agua con presencia de *E.*

coli O157:H7 pueden contaminar pasturas y cultivos donde sobreviven y sirven como fuentes de contaminación de forraje (Maule, 2000). Así, se han reportado brotes relacionados a la contaminación de materia fecal por escorrentía efluente de establos lecheros (Jackson *et al.*, 1998). El serotipo O157:H7 se ha encontrado en bebederos de agua (LeJeune *et al.*, 2001), agua contaminada de lagos, lagunas y piscinas (Chalmers *et al.*, 2000). El sedimento del bebedero contaminado con *E. coli* O157:H7 puede servir como reservorio del agente patógeno por periodos prolongados en granjas (Hancock *et al.*, 2000).

1.2.4. Temporada

La temporada del año es un factor importante en la presentación de la enfermedad, así, en las épocas de verano y otoño es donde más se incrementa la frecuencia de aislamientos de *E. coli* O157:H7 en las heces de animales (Sánchez *et al.*, 2002). El incremento de las poblaciones de insectos como las moscas o la migración de las aves podrían afectar la prevalencia de EHEC O157:H7 en el ambiente de la granja (Heuvelink *et al.*, 1998). En el caso de la transmisión a los humanos, factores como manejo de la comida, hábitos estacionales, y procedimientos de cocción para carne molida podrían tener un rol en el incremento de la prevalencia (Besser *et al.*, 1997; Hancock *et al.*, 2000).

1.2.5. Transmisión

La principal fuente de infección de STEC y EHEC en bovinos es el agua que se encuentra en los bebederos, los forrajes y el medio donde se da la producción animal, la cual se encuentra contaminada con heces; siendo demostrada la transmisión horizontal de *E. coli* O157:H7 entre vacunos de forma experimental y natural (Besser *et al.*, 2001).

La contaminación de alimentos tales como granos, soya, ensilaje y heno podría ocurrir en los campos de cosecha debido al regadío con aguas contaminadas, uso de fertilizantes naturales, a través de especies silvestres, heces de mamíferos y durante el transporte (Davis *et al.*, 2003).

Otra fuente de infección son los comederos, donde su contaminación podría ocurrir por medio de la saliva o por la defecación del ganado, animales silvestres, roedores, aves o insectos u otras especies que actúan como reservorios de la bacteria (Hancock *et al.*, 1997).

La transmisión de EHEC a seres humanos se realiza a través de la vía fecal-oral mediante el contacto directo con heces contaminadas de animales y de humanos, habiéndose recuperado cepas de *E. coli* patógenas y en menor frecuencia EPEC en niños, siendo este último patotipo similar a lo encontrado en alpacas que convivían junto con las personas (OIE, 2004).

Una forma indirecta de transmisión es mediante la ingesta de alimentos, contacto con ambientes contaminados con heces, fuentes de aguas contaminadas y por transmisión en el laboratorio (OIE, 2004).

1.3. Serotipos de *Escherichia coli* enterohemorrágica

La clasificación de cepas de *E. coli* está basada en la determinación de los antígenos externos o superficiales O (somáticos), y antígenos H (flagelares). El serotipo es definido por la combinación de los antígenos O:H (Vadillo *et al.*, 2002; Quinn y Markey, 2005) y designados con números arábigos como por ejemplo O133:H2 (Quinn y Markey, 2005). Existen más de 170 diferentes serogrupos y más de 700 serotipos identificados, siendo alrededor de 200 serotipos clasificados como *E. coli* productora de toxina *Shiga* que han sido aislados de animales, alimentos y otras fuentes (LeBlanc, 2003).

En *E. coli*, se reconocen 173 antígenos O (O1 a O181) y 53 antígenos H (H1 a H56), siendo algunas de ellas frecuentes entre las cepas patógenas (Vadillo *et al.*, 2002). El antígeno somático O es un polisacárido termoestable que forma parte del lipopolisacárido, mientras que los antígenos flagelares H son de naturaleza proteica y termolábiles (Quinn y Markey, 2005). El antígeno K corresponde con el polisacárido

capsular ácido que envuelve la pared celular, y el antígeno F (fimbriales) es proteináceo y actúa como adhesina facilitando la unión a la superficie de la mucosa (Quinn y Markey, 2005).

1.3.1. *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7

En base a estudios epidemiológicos, estos serotipos son responsables de un gran número de serias infecciones humanas, principalmente EHEC O157:H7 (Beutin *et al.*, 1994). *E. coli* O157:H7 presenta características fenotípicas distintas de otras *E. coli*, tales como: ser Gram negativo, poseer flagelos, ser anaerobio facultativo, oxidasa negativo, indol positivo y presentar poca o nula fermentación del sorbitol. Genotípicamente, todas las EHEC O157:H7 poseen los genes *eae* (gen que codifica la intimina) y el plásmido pO157 (gen que codifica el plásmido pO157) frente al menos del 30% de cepas de STEC no O157 (Vadillo *et al.*, 2002).

Los análisis evolutivos han evidenciado que *E. coli* O157:H7 está genéticamente muy relacionado con la cepa EPEC O55:H7. Esto se sustenta en el modelo de Feng *et al.* (1998), quien propuso que *E. coli* O55:H7 y *E. coli* O157:H7 descienden de una cepa ancestral común, que contiene la isla de patogenicidad, *Locus* de borrado del enterocito (LEE), capacidad para fermentar sorbitol, expresar β -glucoronidasa (GUD+) y provocar diarrea mediante un mecanismo de adhesión y borrado (lesión A/E), el cual ya ha sido explicado anteriormente.

1.3.2. *Escherichia coli* enterohemorrágica no O157:H7

Los serotipos de EHEC tales como O26:H11, O103:H2, O11:H-(NM) y O113:H21 son los que adquieren mayor importancia clínica después del serotipo O157:H7 (Griffin y Tauxe, 1991).

Ha sido reportado el rol de EHEC no O157:H7 en enfermedades diarreicas, CH y SUH; sin embargo, poco se conoce sobre la epidemiología de estos serotipos en comparación con EHEC O157:H7. Asimismo, la mayoría de EHEC no O157 no

están realmente identificadas; y su prevalencia es probablemente subestimada debido a que estas cepas poseen factores de virulencia variables y al uso de medios selectivos específicos para la detección de O157:H7 (Percival *et al.*, 2014).

1.4. Factores de virulencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica

Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad. Así, los factores de virulencia primarios más definidos de EHEC son la Stx, la intimina y la enterohemolisina (Nataro y Kaper, 1998).

1.4.1. Toxina *Shiga*

La toxina *Shiga* (Stx) está considerado como el principal factor de virulencia, y es una característica que define la patogénesis de enfermedades causadas por EHEC y STEC (Kimmitt *et al.*, 2000). La producción de esta toxina por STEC es variable, ya que puede producir Stx1, Stx2, ambas toxinas, o variantes de Stx (Boerlin *et al.*, 1999), habiendo sido involucradas en la presentación de diarrea y enterocolitis e inducen al daño endotelial de los capilares del riñón, el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso central (Arbus, 1997), considerándose como el principal factor que conlleva a la muerte y a muchos otros signos clínicos en pacientes infectados con EHEC (Sears y Kaper, 1996).

Estas toxinas son inhibidoras de la síntesis proteica, y los genes que codifican los Stx están localizados en el genoma bacteriano de patógenos (Feng *et al.*, 1998). Estas toxinas son específicas para el receptor glicolípido globotriaosilceramida o gal(α)1-4gal(β)1-4 glucosilceramida (Gb3) de la superficie de enterocitos, células del endotelio vascular, células del músculo liso, eritrocitos y células del endotelio renal (Bast *et al.*, 1999), excepto la Stx2e, ya que, esta última, se une con el receptor globotetraosilceramida (Gb4) (Stein *et al.*, 1992).

La toxina *Shiga* está constituida por una estructura básica compuesta por subunidades A-B, las cuales están conservadas a través de todos los miembros de su familia. Estas toxinas están compuestas de una subunidad monomérica catalítica A, responsable de la actividad enzimática; y una subunidad pentámerica comprendida por 5 unidades de monómeros B, involucrada en la unión con el receptor glicolípido Gb3 sobre la superficie de la célula objetivo (Stein *et al.*, 1992).

Las toxinas Stx1 y Stx2 tienen 55 y 57% de secuencia de identidad en las subunidades A y B respectivamente. La subunidad A actúa como un RNA ribosomal N-glucosidasa cortando un residuo de adenina del RNA ribosomal (rRNA 28s) (Nataro y Kaper, 1998).

La translocación de la toxina al flujo sanguíneo se debería a la lesión del epitelio intestinal, a la acción del lipopolisacárido bacteriano (LPS) y a otros mediadores inflamatorios tales como citoquinas, interleucinas y prostaglandinas. Esta posibilidad se respalda debido a que los pacientes con diarrea sanguinolenta son más propensos a desarrollar SUH frente a los que no presentan este tipo de diarrea (Nguyen y Sperandio, 2012). Este receptor Gb3 está presente en altas concentraciones en el tejido renal humano (Boyd y Lingwood, 1989) y Stx es citotóxica en células endoteliales renales humanas *in vitro*. En el caso de los bovinos, es desconocido el rol de Stx en la colonización intestinal y como causante de enfermedad (Nguyen y Sperandio, 2012).

1.4.2. Locus del borrado del enterocito (LEE)

La isla de patogenicidad cromosomal, denominada *locus* de borrado del enterocito (LEE: *Locus for Enterocyte Effacement*) (Vadillo *et al.*, 2002; Cookson y Woodward, 2003) contiene los genes responsables de la unión íntima de la bacteria con la membrana apical del enterocito, y para la subsecuente destrucción de las microvellosidades, llamada histológicamente lesión AE (*attachment effacement*) (Nataro y Kaper, 1998; Torres y Kaper, 2002). Esta lesión AE se caracteriza por la

destrucción de las microvellosidades de las células intestinales, la adhesión de la bacteria a las células intestinales, y un cambio significativo del citoesqueleto celular con la acumulación de actina polimerizada formando un pedestal (Nataro y Kaper, 1998; Dean y Kenny, 2009).

LEE está constituido por tres principales regiones funcionales. Una región que contiene los genes *esc* y *esp* codifican el sistema de expresión tipo III (TTSS), y que facilitan el transporte de proteínas Esp y Tir. Otra región contiene el gen *eae* que expresa la intimina, y el gen *tir* (receptor translocado de intimina) que codifica una proteína receptora para la intimina. Por último, una tercera región contiene el gen *esp* que codifica la secreción de las proteínas *Esp* (EspA, EspB, EspD, y EspF), necesarias para la transducción de señales en la célula del hospedador para la lesión AE (Sinclair *et al.*, 2006).

Para el desarrollo de la lesión AE, el gen *esc* codifica una proteína para formar un poro en la membrana celular externa de la bacteria; y la proteína EspA forma un aparato hueco de translocación cilíndrico a través del cual EspB, EspD y Tir son translocados hacia las células intestinales. Por su parte, las proteínas EspB y EspD forman un poro en la membrana de la célula intestinal, a través de la cual las proteínas bacterianas son translocadas dentro del citosol de estas células (Ebel *et al.*, 1996). Finalmente, EspB activa los eventos que median el borrado de las microvellosidades y la formación de una estructura semejante a un pedestal (Kenny *et al.*, 1997).

1.4.2.1. Intimina

La intimina es una proteína de membrana externa, codificada por el gen cromosomal *eae* (Vadillo *et al.*, 2002) y asociada con la virulencia de EHEC. Esta proteína es detectada en la mayoría de las cepas causantes de SUH (>90%); sin embargo, el gen *eae* no se encuentra siempre presente en las cepas de *E. coli* productoras de toxina Stx aisladas de ganado vacuno sano y terneros sin diarrea. El

gen *eae* es el principal implicado en la lesión AE; existiendo además otros genes que intervienen en dicho proceso tales como *esp* y *tir* (Jenkins *et al.*, 2002).

1.4.3. Plásmido pO157

Todas las cepas O157:H7 contiene un plásmido pO157 (Ochman y Jones, 2000). Este plásmido está presente en la mayoría pero no en todas las cepas de *E. coli* productoras de toxina *Shiga* aisladas de humanos y animales (Barret *et al.*, 1992; Beutin *et al.*, 1994). Cabe mencionar que, muchas de las cepas de STEC producen una hemolisina denominada enterohemolisina que se encuentra codificada en este plásmido (Vadillo *et al.*, 2002). Otros factores de virulencia dentro del plásmido incluyen una catalasa-peroxidasa (Ochman y Jones, 2000).

El plásmido pO157 también codifica las fimbrias que permiten la unión de la bacteria al epitelio del intestino grueso antes de la acción de la intimina (Nataro y Kaper, 1998; Vadillo *et al.*, 2002). Muchos estudios epidemiológicos sugieren una fuerte correlación entre la presencia de este plásmido y el desarrollo de SUH (Schmidt y Karch, 1996).

1.4.4. Enterohemolisina

La enterohemolisina (Ehx) es codificada por el gen *hlyA* (Barret *et al.*, 1992), y se encuentra en la mayoría de cepas EHEC O157:H7 asociadas con SUH (Law y Kelly, 1995; Schmidt *et al.*, 1995). El fenotipo enterohemolítico producido por Ehx es caracterizado por pequeñas zonas de hemolisis en agar sangre (LeBlanc, 2003). Además, *Ehx* induce una fuerte actividad citolítica en células de animales y humanos, produciendo lisis de eritrocitos *in vivo*, liberando el grupo hemo y creando una fuente de hierro que es utilizado por *E. coli* O157:H7 para así estimular el crecimiento bacteriano *in vitro* (Law y Kelly, 1995; Nataro y Kaper, 1998). Otro tipo de Hly, enterohemolisina (E-Hly), la cual es diferente de la Hly producida por cepas ETEC de origen porcino y por cepas de *E. coli* que causan infecciones extraintestinales en humanos, han sido descritas en cepas de ETEC (Karch *et al.*, 1992).

1.4.5. Otros factores de virulencia

Generalmente, *E. coli* no patogénicas no crecen bien bajo temperaturas de refrigeración usados en la industria de alimentos (2-5°C); a pesar de ello, se ha demostrado que *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir en la carne molida conservada a -20°C por más de 9 meses (Doyle y Shoeni, 1984), desarrollándose también en otros alimentos como la leche pasteurizada (Heuvelink *et al.*, 1998) y frutas conservadas a 25°C (Del Rosario y Beuchat, 1995).

Otra de las características de *E. coli* es su supervivencia a niveles muy bajos de pH (Glass *et al.*, 1992). Por ejemplo, en el caso de STEC, la supervivencia esta mediada por el gen *rpoS*, que codifica el factor sigma de fase estacionaria, y como consecuencia le permite resistir la acidez del estómago para luego colonizar el intestino (Leyer *et al.*, 1995); asimismo, contiene un sistema especializado de transporte de hierro que le permite a este microorganismo usar el grupo heme (Torres y Payne, 1997).

1.5. Fisiopatología de la enfermedad

La mayoría de cepas de *Escherichia coli* son habitantes comensales de mamíferos (Quinn y Markey, 2005); sin embargo, algunas cepas son capaces de causar enfermedad intestinal o extraintestinal. La EHEC al ser ingerida oralmente, debe resistir el ambiente del estómago, seguido por la competición con la flora normal del intestino para establecer la colonización intestinal. Aunque EHEC se une íntimamente a los enterocitos, no llega a invadirlos (Fig. 2). El mecanismo de acción de las cepas de EHEC involucra la unión al epitelio del intestino grueso a través de unas fimbrias codificadas en el plásmido pO157 y posteriormente, el barrido de las microvellosidades intestinales por la acción de las intiminas (Vadillo *et al.*, 2002).

La forma de producir la lesión AE consiste en un evento de múltiples fases, iniciado por la adherencia de la bacteria a las microvellosidades, la transducción de

señales de los enterocitos, la agregación de la actina del citoesqueleto y la destrucción de microvellosidades, llevando a una adhesión íntima de la bacteria a la superficie celular. Después de la liberación de Stx en el tracto intestinal ocurre el daño apoptótico de la superficie de la mucosa. Las Stx se absorben primero por el epitelio intestinal y luego son translocados al flujo sanguíneo (Nataro y Kaper, 1998).

EPEC es un patotipo que coloniza la superficie de la mucosa, elabora enterotoxinas y exhibe limitada capacidad invasiva en cultivo celulares; sin embargo, esto último no ha sido demostrado *in vivo* (Gyles *et al.*, 2010). El mecanismo de diarrea producido por cepas de EPEC se da por la acción de las enterotoxinas termolábil (LT) o termoestable (ST), pudiendo expresar solo LT, solo ST o ambos (Turner *et al.*, 2006).

Después de ocurrida la unión a la membrana de la célula hospedera, la toxina es endocitada y translocada a la célula en un proceso que envuelve un transporte por vesículas del aparato de Golgi. Solo cuando las subunidades B están unidas ocurre la internalización de la subunidad A. Dentro de la célula, la subunidad A se debe dividir enzimáticamente para que se active en A1 y A2 (Tsuiji *et al.*, 1995). El blanco celular de LT es la adenilato ciclasa localizado en la membrana basolateral de células intestinales polarizadas. El péptido A1 tiene una actividad ADP – ribosiltransferasa y actúa transfiriendo un grupo funcional ADP-ribosil del NAD a la subunidad alfa de la proteína GTP que une el GS que estimula la actividad del adenilato ciclasa. La activación del adenilato ciclasa causa la conversión del trifosfato de adenosina (ATP) a monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (Tauschek *et al.*, 2002). El aumento de AMPc conduce a la activación de la proteinkinasa dependiente de AMPc conllevando a la fosforilación supranormal de los canales de cloruro, situados en la membrana apical de la célula epitelial. El incremento luminal del ión arrastra agua de manera pasiva por la vía paracelular resultando en diarrea osmótica. La secreción activa en la luz del intestino de iones cloruro y bicarbonato procedentes de las células de la mucosa que va al lumen del intestino origina un cambio iónico originando la secreción de grandes cantidades de agua en el lumen intestinal (Madigan *et al.*, 2006).

Con respecto a la acción de la toxina STa, se ha demostrado que es de acción más rápida que la toxina LT debido a la localización apical de su receptor. Los mecanismos alternativos de acción para STa incluyen prostaglandinas, ácido araquidónico y leucotrienos. La respuesta secretoria a STa involucra también la liberación de fosfatidilinositol y diacilglicerol, activación de proteinkinasa C, incremento de calcio intracelular y cambios a nivel de microfilamentos (Tauschek *et al.*, 2002).

En caso del STb, esta toxina está asociada primariamente con cepas ETEC aisladas de cerdos, siendo también aislado de humanos. STb induce lesiones histológicas en el epitelio intestinal, que consiste en la pérdida de las microvellosidades y atrofia parcial de las mismas. A diferencia de la secreción inducida del ión cloro por STa, STb estimula la secreción de bicarbonato de la células intestinales (Tsuji *et al.*, 1995; Nataro y Kaper, 1998).

EPEC es una categoría importante de *E. coli* causante de diarrea en individuos jóvenes, siendo la lesión característica de EPEC la lesión adhesión y barrido, la cual es observada en muestras intestinales y en biopsias de individuos. Esta cepa exhibe adherencia difusa en cultivos celulares y es causante de diarrea, pero con mecanismos diferentes a los presentados en otras categorías ya antes mencionadas (Girón *et al.*, 1991), caracterizada por el barrido de las microvellosidades y la adherencia íntima de la bacteria a la membrana de la célula epitelial. Ocurren cambios marcados del citoesqueleto, formando estructuras a manera de “pedestal”, la cual extienden hacia afuera a la célula como si emitieran pseudópodos (Nataro y Kaper, 1998).

Estas lesiones A/E tanto en animales como cultivos celulares son similares a los producidos por *E. coli* enterohemorrágica y *Hafnia alvei*, siendo unas pocas cepas las que producen esta lesión. Además de EPEC y EHEC, una variedad de cepas de *E. coli* capaces de ocasionar A/E se han aislado de conejos (Cantey y Blake, 1997),

terneros (Fischer *et al.*, 1994), cerdos (Zhu *et al.*, 1994) y caninos (Drolet *et al.*, 1994).

Se ha propuesto un modelo de 3 fases en la patogénesis de la enfermedad por EPEC: adherencia localizada, transducción de la señal y adherencia íntima (Donnenberg y Kaper, 1992). La adherencia localizada consiste en la adherencia celular (cultivos), la cual es una capacidad de las cepas EPEC, siguiendo un patrón localizado (Nataro y Kaper, 1998), cuyo mecanismo es dependiente de la presencia de un plásmido de 60 MDa, la cual es eliminada cuando se pierde este plásmido. Este plásmido fue señalado como el factor de adherencia de EPEC (EAF o EPEC Adherence Factor) (Quinn y Markey, 2005).

La transducción de señales es inducida por la adherencia de EPEC a las células epiteliales. Los genes bacterianos de esta actividad se codifican en una “isla de patogenicidad” de 35 Kb llamado LEE (*locus of enterocyte effacement*), que codifica un sistema de secreción tipo III, múltiples proteínas y adhesina bacteriana llamada Intimina. La infección con EPEC induce incrementos en los niveles de calcio intracelular (Ca^{2+}), en cultivo de células epiteliales a las cuales se unen (Baldwin *et al.*, 1993). El calcio originado proviene de orgánulos de almacenamiento como el retículo endoplásmico ocurriendo un incremento de la polimerización y acumulación de la actina y formación de la lesión A/E. La adherencia de EPEC a la célula epitelial da lugar a la fosforilación de varias proteínas en los residuos de serina y treonina, como la cadena ligera de miosina. La activación de proteína kinasa C induce cambios rápidos en los fluidos intestinales y secreción de electrolitos, asimismo a la activación y fosforilación de la cadena ligera de miosina (Manjarrez-Hernandez *et al.*, 1996). Las proteínas tirosina fosforiladas son parte de la lesión A/E y se encuentran distribuidas por debajo de la bacteria adherente localizado en los extremos del “pedestal” y asimismo, se ha demostrado que la proteína Hp80 tirosina fosforilada sirve como receptor para la adhesina Intimina (Rosenshine *et al.*, 1996); sin embargo, se determinó que es una proteína llamada Tir (receptor translocado para Intimina) la que funciona como receptor de la Intimina (Kenny *et al.*, 1997). Otro

hallazgo que ha sido reportado como parte de la fisiopatología de la enfermedad, es la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) (Savkovic *et al.*, 1996).

Finalmente, la adherencia íntima de EPEC a la célula epitelial esta mediada por una proteína externa de membrana de 94 a 97 KDa llamada Intimina. El gen que lo codifica es *eae* (por *E. coli* attaching and effacing) ubicado en la isla de patogenicidad LEE a nivel cromosómico (Nataro y Kaper, 1998). Este gen está presente en todas las cepas EPEC, EHEC, *Citrobacter rodentium* y *Hafnia alvei* capaces de producir lesión A/E pero ausentes en cepas de *E. coli* de flora normal y otras bacterias que no produzcan la lesión A/E. La región altamente diferenciada del C-terminal es la porción de la molécula que une los receptores a la célula epitelial (Frankel *et al.*, 1994), y esta diversidad puede atribuir diversos patrones de colonización dentro del intestino. Los patrones totales demuestran la variabilidad de la región C-terminal y la alta conservación en la región N-terminal. En cepas EPEC no es suficiente la expresión de Intimina para mediar la adherencia a las células epiteliales, para lo cual es necesaria la transducción de señales en la célula huésped para formar un receptor funcional propio del hospedero (Rosenshine *et al.*, 1996).

La pérdida significativa de las microvellosidades absorbentes en la lesión A/E trae como consecuencia diarrea por mala absorción; sin embargo, en inoculaciones experimentales, el periodo de incubación observado fue de apenas 2.9 horas entre la ingestión de las bacterias y la producción de diarrea (Donnenberg *et al.*, 1993). Los mecanismos de la diarrea involucran alteración en el transporte activo de iones y disminución significativa del potencial transmembrana en las células epiteliales infectadas (Stein *et al.*, 1992), disminución de la resistencia transepitelial y aumentos de la corriente de cortocircuito (Isc) y diferencia de potencial, lo que sugiere la secreción activa de iones (Donnenberg *et al.*, 1997), implicando a la secreción de iones cloruro. También se ha observado una respuesta inflamatoria local, que induce una migración de polimorfonucleares (Savkovic *et al.*, 1996), resultando en incremento de Isc debido a la secreción de iones cloruro (Madara *et al.*, 1993). La diarrea prolongada resultaría como consecuencia de mala absorción debido a la

pérdida del borde en cepillo, sumado a una respuesta inflamatoria local y a un aumento de la permeabilidad intestinal también podrían contribuir a la diarrea (Nataro y Kaper, 1998).

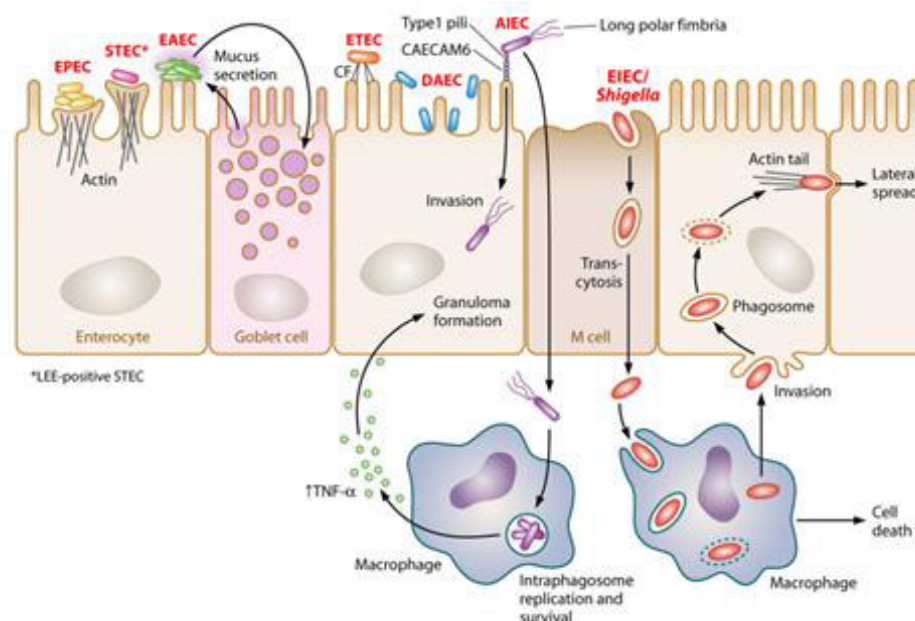


Figura 2. Patrones de adherencia de *Escherichia coli* entérica. *Escherichia coli* requiere la adherencia al epitelio del hospedero (Fuente: Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*, 2013)

1.6. Presentación clínica de la enfermedad

1.6.1. Animales

La infección del tracto gastrointestinal del ganado vacuno adulto y terneros destetados con *E. coli* O157:H7 es asintomática (Stevens *et al.*, 2002); considerándose no patógeno para esta especie, y es excretado en las heces de animales sanos (Sánchez *et al.*, 2002).

Algunos autores han reportado casos esporádicos de colitis hemorrágica y diarrea en terneros, siendo por lo general observados en trabajos experimentales

cuando se administran altas dosis de EHEC (mayores a 10^{10} UFC) (Nataro y Kaper, 1998). Los análisis histológicos de epitelios intestinales de bovinos infectados con *E. coli* O157:H7 muestran una adhesión íntima de la bacteria (no en todos los casos); y una respuesta inflamatoria (Stevens *et al.*, 2002). En un estudio realizado en cerdos, demostró que la dosis infectiva experimental de *E. coli* O157:H7 es de 6×10^3 UFC, y el periodo de excreción fue de 2 meses post inoculación (Booher *et al.*, 2002).

Las cepas de *E. coli* en alpacas producen un incremento en la secreción de electrolitos que van del sistema circulatorio a la luz intestinal, siendo a veces profuso. Las heces suelen ser blanquecinas, blanco amarillentas o verdosas, sufriendo el animal una pérdida de peso por deshidratación a consecuencia de la diarrea, y pudiendo presentarse aumento del volumen abdominal por distensión intestinal, pero la temperatura corporal se mantiene normal. Algunas crías presentan apetito depravado que se manifiesta por ingestión de tierra u otras partículas extrañas. La diarrea puede durar 3 a 5 días (en algunos casos más tiempo), especialmente cuando persisten las malas condiciones higiénicas. En estadíos más avanzados de la enfermedad, se evidencian crías muy deprimidas, postradas y deshidratadas que finalmente mueren. Al parecer la muerte ocurre por múltiples infecciones, en las que *E. coli* juega un rol muy importante (Ameghino y DeMartini, 1991).

1.6.2. Humanos

Las manifestaciones clínicas como CH y SUH en humanos están asociadas a infecciones causadas por *E. coli* O157:H7 (Besser *et al.*, 1997) y otras EHEC, presentándose más severamente en niños, sobre todo en menores de 5 años de edad y ancianos. El curso de la infección resulta en la presentación de síntomas clínicos de 1 a 8 días post infección, teniendo un periodo de incubación medio de 3 a 4 días. Los síntomas clínicos se inician con diarrea acuosa, dolor abdominal, y ocasionalmente náuseas y vómitos (Thorpe, 2004). Se ha evidenciado que en casos de diarrea acuosa, ésta puede o no progresar a diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica (Thorpe, 2004).

La colitis hemorrágica se caracteriza por severos dolores abdominales, heces sanguinolentas, elevación de la temperatura y evidencia de edema en la mucosa colónica (Thorpe, 2004). El sangrado en las heces se evidencia de 2 a 3 días postinfección, y la resolución de CH generalmente requiere de 6 a 8 días (Besser *et al.*, 1997).

El SUH es definido por la presencia de anemia hemolítica y falla renal, y la trombocitopenia como hallazgo de laboratorio, siendo una enfermedad de inicio agudo, presentando las siguientes manifestaciones: anuria, petequias, palidez, hematomas, edema, oliguria, hipertensión arterial, cambios neurológicos, letargia y convulsiones (Thorpe, 2004). La mayoría de los pacientes se recuperan con terapia de soporte, pero del 3 al 5% de niños afectados mueren, y aproximadamente de 12 a 30% quedan con severas secuelas que incluyen hipertensión, daño renal o manifestaciones del sistema nervioso central (Griffin, 1995).

1.7. Métodos de diagnóstico

1.7.1. Aislamiento microbiano

Para realizar el aislamiento de *E. coli* son adecuados los medios que inhiben las bacterias Gram positivas, como el agar MacConkey (Nicolet, 1986), donde la acción de la fermentación de la lactosa resulta en la aparición de colonias de color rosado (Quinn y Markey, 2005). Asimismo, el medio selectivo y más utilizado para el aislamiento de *E. coli* O157:H7 es el agar Sorbitol-MacConkey (SMAC) (March y Ratman, 1986), que contiene 1% de sorbitol, en lugar de lactosa.

Existen varias modificaciones del agar SMAC que mejoran la selectividad, diferenciación y la cantidad de cepas recuperadas de *E. coli* O157:H7; optimizándose a través de un proceso previo de enriquecimiento en caldo selectivo, como el caldo tripticasa soya complementado con cefixime y vancomicina (Karch *et al.*, 1996).

1.7.2. Actividad citotóxica

Las pruebas para la detección de la actividad citotóxica incluyen técnicas de cultivo celular con células Vero o HeLa (Strockbine *et al.*, 1998). Esta citotoxicidad causada por Stx sobre las células Vero es un método sumamente sensible y sirve para confirmar la presencia actual o reciente de *E. coli* productora de toxina *Shiga* (Karmali, 1989; Paton y Paton, 1998).

El diagnóstico de toxinas tipo Shiga de *E. coli* enterohemorrágica usando la línea celular Vero, es una de las más ampliamente usadas (Mercado *et al.*, 2004; El Sayed Zaki y El-Adrosy, 2007).

También se usa cultivos celulares como la línea HEp-2, derivada de carcinoma de laringe humano, en las que se analiza la adherencia de cepas EPEC, los cuales siguen un patrón localizado de adherencia (Quinn y Markey, 2005).

1.7.3. Técnicas bioquímicas

En muestras fecales o hisopados rectales es necesario solo un medio de aislamiento selectivo y además de la identificación preliminar es necesario determinar otras características de identificación para la identificación final de *E. coli*. La determinación de la especie se realiza mediante pruebas bioquímicas, las cuales miden las características metabólicas:

a) Producción de indol: el indol es un componente de la degradación del triptófano. *E. coli* posee la enzima triptofanasa que convierte el triptófano en indol, ácido pirúvico y amonio.

b) Fermentación ácido mixta: las bacterias muestran dos vías del metabolismo del piruvato: ácido mixta y butilenglicólica, a partir de glucosa. Las bacterias que siguen la fermentación ácida mixta producen ácido acético, etanol, H₂, CO₂, ácido propiónico y láctico.

- c) No utilización del citrato: determina la capacidad del microorganismo de usar el citrato como única fuente de carbono.
- d) No poseen la enzima ureasa: por tanto no son degradadoras de úrea.
- e) Poseen la enzima lisina descarboxilasa: muchas especies bacterianas producen enzimas que pueden descarboxilar aminoácidos específicos, produciendo aminas como productos de degradación.
- f) No poseen la enzima fenilalanina desaminasa: bacterias como *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* y algunos aislamientos raros de *Enterobacter* poseen la enzima.
- g) No producen sulfuro de hidrógeno: por metabolismo de aminoácidos azufrados.
- h) Movilidad: Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y localización va a variar entre especies.

1.7.4. Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

En 1984, Schwartz y Cantor idearon una manera de separar moléculas grandes de ADN (hasta 10 Mb); hasta la fecha ha tenido una gran aceptación, así como una gama amplia de aplicaciones (Schwartz y Cantor 1984; Nassonova 2008). En este método, el DNA viaja a través de un gel de agarosa concentrado, bajo la influencia de dos campos eléctricos. Los dos ángulos de los campos eléctricos se encuentran cerca a la perpendicularidad, no son uniformes en la intensidad de campo y cambian de manera alterna (pulsos).

La PFGE puede ser utilizado para la comparación de grandes fragmentos de ADN genómico después de la digestión con una enzima de restricción. Dado que el cromosoma bacteriano es típicamente una molécula circular, esta digestión produce varias moléculas lineales de ADN (Singer *et al.*, 2004).

De manera general, la PFGE es una técnica que permite la separación de fragmentos de ADN de alto peso molecular (10 Kb a 10 Mb) (Nassonova 2008) y

tiene varias utilidades en el rastreo e investigación de los brotes de origen alimentario, también como la detección temprana de éstos por el aumento de la incidencia de alguno de los subtipos usualmente implicados en brotes (Swaminathan, 2001).

El desarrollo de PFGE ha aumentado en dos órdenes de magnitud el tamaño de las moléculas de ADN que pueden fraccionarse y analizarse de forma rutinaria. Este aumento es de gran importancia en biología molecular, ya que simplifica muchas investigaciones previamente laboriosas y hacen posible muchas otras nuevas. A pesar de sus más de 20 años de historia como un método de tipificación, PFGE ha demostrado una capacidad de resistencia excepcional.

1.7.4.1. Fundamento de la técnica

En el dispositivo diseñado por Schwartz y Cantor, el campo eléctrico cambia en intervalos determinados formando ángulo de 90° (Schwartz y Cantor 1984). En un gel de forma rectangular un campo es homogéneo y es generado por dos filas de electrodos de puntos ubicados paralelamente y en lados opuestos del gel; el otro campo no es homogéneo y es generado por una fila de electrodos de puntos como cátodo y un electrodo de punto al lado opuesto como ánodo. Este sistema se conoce como “Electroforesis en Gradiente de Campo Pulsado” (PFGE) (Fig. 3).

En este sistema, el ángulo entre los vectores de fuerza del campo varían en regiones diferentes del gel (110° - 150°), por lo tanto, las moléculas de igual tamaño migran con velocidades diferentes, dependiendo de su posición inicial en el gel; esto complica la comparación de las movilidades electroforéticas de las moléculas de ADN que se encuentran en los carriles vecinos por lo que es imposible calcular con precisión la talla molecular. Debido a que la mayoría de sistemas actuales se basan en campos homogéneos, la abreviatura de “PFGE” tuvo entonces una nueva interpretación (Electroforesis en Gel de Campo Pulsado; Nasonova, 2008).

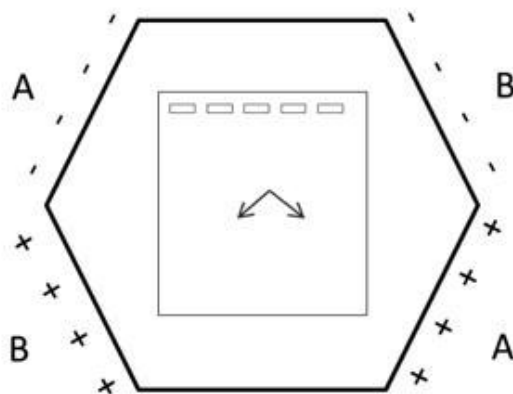


Figura 3. Distribución de los electrodos en el equipo CHEF utilizado en PFGE

1.7.4.2. Enzimas de restricción

Entre todas las proteínas que se unen a la secuencia de ADN de forma específica, las enzimas de restricción se consideran las más exigentes. Estas enzimas, también denominadas endonucleasas de restricción, se producen naturalmente en bacterias y arqueas, y actúan para proteger a los microorganismos de las infecciones por virus y moléculas de ADN parasitarias. El ADN propio de los microorganismos está protegido de la escisión por estas enzimas de restricción denominadas “metiltransferasas de modificación”. Las enzimas de restricción se unen a secuencias cortas de pares de bases de ADN y catalizan la escisión de las dos hebras de ADN en la vecindad de los sitios de unión, rompiendo el ADN en fragmentos. Por ejemplo, la enzima XbaI, purificada del microorganismo *Xantomonas badrii*, es una endonucleasa de restricción tipo II que corta el ADN de doble cadena en el sitio de reconocimiento de 6 pares de bases 5'-T/CTAGA-3' para generar fragmentos de ADN con extremos cohesivos 5'. Esta enzima de restricción solo cortará parcialmente aislados de ADN de cepas de *E. coli* que presenten la enzima metilasa *dam* (cepas *dam*⁺), asimismo, se sabe que pueden cortar sitios de reconocimiento secundarios bajo condiciones no óptimas (Goering, 2010). Esta escisión se puede detectar con una gran sensibilidad *in vitro*, y así la tasa de error de

enzimas de restricción - frecuencia con la que se unen a las secuencias y cortan secuencias "erróneas" pueden ser medidas con precisión. En su gran mayoría, la tasa de error es muy baja, 5/10 a 6/10, o menos (Taylor y Halford, 1989; Halford *et al.*, 1993); sin embargo, para algunos es demasiado bajo para ser medido.

Debido a que las enzimas de restricción discriminan con tal precisión, han sido considerados como "gold standard" para el estudio del mecanismo molecular del reconocimiento de secuencias así como la PFGE, la cual es considerada como la prueba "gold standard" dentro de las herramientas diagnósticas de tipificación molecular. Comenzando con EcoRI a finales de 1980 y luego EcoRV y PvuII (Cheng *et al.*, 1994) a principios de 1990, cristalógrafos de rayos X han resuelto las estructuras de numerosos complejos ADN-enzima de restricción. Sobre la base de estos y otros estudios, se han propuesto tres procesos, dependiendo de una forma u otra en las uniones de hidrógeno. Estos se denominan "lectura directa", "lectura indirecta", y mediadas por agua.

1.7.4.3. Tipos y variantes de PFGE

El término original Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) fue utilizado por Schwartz y Cantor (1984) para cualquier separación en gel que emplease campos eléctricos múltiples y alternos.

PFGE resuelve moléculas de ADN de casi un milímetro de longitud mediante el uso de campos eléctricos de campo pulsado, que modulan selectivamente movibilidades de una manera dependiente del tamaño. El efecto de electroforesis pulsada ha sido utilizado por una variedad de instrumentos (FIGE, TAFE, CHEF, OFAGE, PACE y la rotación de gel de electrodo) para aumentar el tamaño de resolución tanto de moléculas grandes como pequeñas de ADN (Lai *et al.*, 1989). Es importante la hora de elegir un sistema de PFGE, el evaluar costo y rendimiento en función de su uso previsto (Fig. 4).

Hay diferentes tipos de PFGE, los cuales se describen a continuación:

a) *Field-Inversion Gel Electrophoresis (FIGE)*: En 1986, Carle, Frank Olson desarrollaron un sistema más sencillo de PFGE denominado FIGE (Field-Inversion Gel Electrophoresis), en el que los dos campos eran apartados 180° (Carle y Olson, 1984). La polaridad del electrodo era revertido a intervalos, con tiempos de impulso más largos que los de reversa para generar un avance neto de migración de la muestra. La migración hacia adelante es lograda mediante el aumento de la proporción de tiempos de pulso avance: reversa de 3:1. Para mejorar la resolución de las bandas por FIGE, la duración de los tiempos de pulso se incrementan progresivamente durante la corrida. FIGE tiene las ventajas de contener carriles rectos y un equipo sencillo. Todo lo que se necesita son cajas de gel estándar y un controlador de pulso. Hoy en día, FIGE es muy popular para las separaciones de los fragmentos más pequeños proporcionando resoluciones aceptables de 800 Kb.

b) *Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis (TAFE)*: Esta forma de PFGE permite la separación de grandes fragmentos de ADN en un formato simple, conveniente y sin las desventajas de la técnica de campo pulsado anterior. En TAFE, el gel está orientado verticalmente y un arreglo simple de cuatro electrodos son colocados no en el plano del gel, sino al frente y posterior a la misma. Las moléculas de la muestra se ven obligadas a zigzaguear a través del espesor del gel, y todos los carriles experimentan los mismos efectos por lo que las bandas permanecen rectas. Como las moléculas se mueven hacia abajo del gel, se les somete a variaciones continuas en la intensidad de campo y el ángulo de reorientación, siendo para todos los carriles por igual. Sin embargo, el ángulo entre los campos eléctricos varía desde la parte superior del gel (115°) a la parte inferior (Aproximadamente 165°) y por lo tanto las moléculas todavía no se mueven a una velocidad constante a lo largo de la longitud del gel. La tecnología de TAFE, con separación regular y sostenida de las bandas de ADN, es de ventaja especial en el estudio de la genética de muchos protozoos patógenos, donde dicho análisis era

imposible en años anteriores. TAFE se ha utilizado para la separación de fragmentos hasta 1,600 Kb (Steward *et al.*, 1988).

c) *Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis (OFAGE)*: Un aparato similar que usaba dos campos eléctricos no homogéneos fue informado por Carle y Olson en 1984. Los principales inconvenientes de estos aparatos se debieron a que los campos eléctricos no eran uniformes, y el ángulo entre el campo eléctrico variaba a través del gel, las moléculas de ADN migraban en diferentes proporciones en función a su ubicación en el gel. Esto es especialmente problemático en la cartografía del genoma de los mamíferos, donde se genera una distribución continua de tamaños de los fragmentos. El ángulo entre los campos eléctricos varía desde menos de 180° y los más de 90°. Las moléculas de ADN de 1.000 a 2.000 kb se pueden separar en OFAGE (Carle y Olson, 1984, Chu *et al.*, 1986).

d) *Programmable Autonomously-Controlled Electrodes (PACE)*: El sistema de electroforesis PACE ofrece un control preciso sobre todos los parámetros de campo eléctrico por parte de la regulación independiente de las tensiones en 24 electrodos dispuestos en un contorno cerrado. La flexibilidad del sistema PACE se deriva de su capacidad para generar un número ilimitado de campos eléctricos de homogeneidad, gradiente de voltaje, la orientación y duración controlada. El sistema PACE puede realizar todos los regímenes de conmutación de campo pulsado anteriores (es decir FIGE, OFAGE, PHOGE, pulsante unidireccional), así como generar tensión sujeta a los campos estáticos homogéneos. El Sistema PACE separa los fragmentos de ADN de 100 pb a más de 6 Mb. Un sistema dirigido por ordenador conocido PACE, diseñado por Lai *et al.* (Lai *et al.*, 1989) puede ser el dispositivo final del PFGE. Es una herramienta muy útil para el estudio de variables tales como tiempo de pulsos, temperatura, concentración de agarosa, tensión y ángulos entre los campos que afectan la migración de ADN (Birren y Lai, 1998).

e) Pulsed-Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis

(PHOGE): La principal diferencia entre este instrumento y otras cajas de gel con campos eléctricos homogéneos es que el ángulo de reorientación del campo es 90°. PHOGE utiliza un ángulo de reorientación de 90°, pero las moléculas de ADN sufren cuatro reorientaciones por ciclo en lugar de dos. Este sistema separa los fragmentos de ADN de hasta 1 Mb (Nassonova 2008).

f) Rotating Gel Electrophoresis (RGE):

En RGE, el campo eléctrico es uniforme y las bandas son rectas porque sólo un conjunto de electrodos es utilizado. RGE hace que sea fácil de realizar la rampa de voltaje y tensión. También permite a los usuarios estudiar los efectos de diferentes ángulos, e incluso variar éstos, durante un experimento de rampa de ángulo. RGE utiliza un solo campo homogéneo y cambia la orientación del campo eléctrico en relación al gel por rotación discontinua y periódica del gel. Las moléculas de ADN migran en los carriles rectos, debido a los campos homogéneos, y las moléculas de ADN de 50 kb a 6.000 kb se pueden separar mediante el ajuste de la frecuencia de rotación del gel. Además, el ángulo de reorientación puede ser fácilmente alterado cambiando simplemente el ángulo de rotación (Gardiner, 1991; Nassonova 2008).

g) Electroforesis de campo eléctrico homogéneo restringido al contorno (CHEF)

El CHEF es el aparato de PFGE mayormente usado. El CHEF provee una solución más sofisticada para los efectos de distorsión de los electrodos de la cámara y los pasivos (Nassonova 2008). En esta PFGE, el campo eléctrico es generado por varios electrodos organizados a lo largo de un contorno hexagonal, el campo es pulsado alternamente, generando así un ángulo de reorientación del ADN de aproximadamente 120°. Esta técnica presenta varias ventajas en comparación a las mencionadas anteriormente como: mayor poder de separación (separa moléculas inferiores a 50 Kb sin distorsión y hasta moléculas de 2 Mb), los carriles electroforéticos son perfectamente rectilíneos y el patrón de separación es

independiente de la posición del gel (Chu *et al.*, 1986). Existen dos diferencias fundamentales por las cuales la CHEF se prefiere sobre las otras variantes de la PFGE: 1) mayor poder de resolución (moléculas de hasta 7 Mb) a diferencia de la FIGE que presenta un poder alto de resolución con moléculas entre 1 y 50 Kb; segundo, el aparato para PFGE variante CHEF tiene la ventaja de poder separar mayor número de muestras (20 aprox.) de ADN en cada corrida (Birren y Lai, 1993).

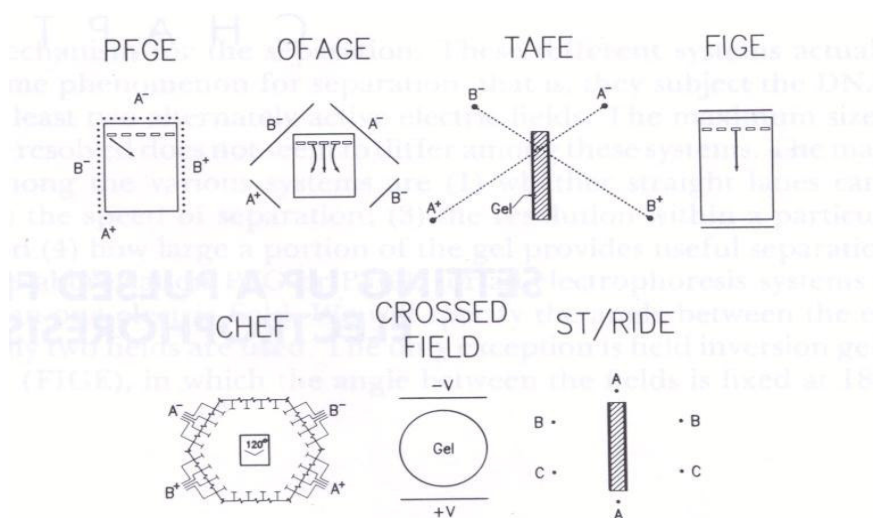


Figura 4. Diagrama esquematizado de los sistemas de gel de campos pulsados publicados hasta la actualidad (Fuente:

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Cobain/method.html>)

1.7.4.4. Aplicaciones del PFGE

La PFGE ha demostrado ser una técnica altamente discriminatoria y por ello es utilizada en estudios epidemiológicos de brotes causados por microorganismos como *Escherichia coli* (Ejrnaes *et al.* 2006), *Salmonella* sp. (Olsen *et al.* 1994), *Shigella* sp. (Angelini *et al.* 2009), *Listeria* sp. (Nascentes *et al.* 2012), *Campylobacter* sp. (Behringer *et al.*, 2011), y *Vibrio cholerae*, (Taneja *et al.*, 2012) entre otros. La técnica se ha empleado para reconocer brotes de infección, detectar transmisión

cruzada de patógenos nosocomiales, identificar la fuente de infección, reconocer las cepas particularmente virulentas y para el seguimiento de los programas de vacunación entre otros (Olive y Bean 1999). Mediante el análisis de los patrones de PFGE, ya sea de manera visual o utilizando un software, se han podido determinar las similitudes genéticas entre los aislamientos, lo que permite inferir si dos aislamientos aparentemente no relacionados tienen la misma procedencia evolutiva (Tenover *et al.*, 1995, Nascentes *et al.*, 2012).

El PFGE, método molecular “gold standard”, para la evaluación de la diversidad genética de STEC O157 (Swaminathan, 2001), principalmente detecta inserciones y/o deleciones dentro de las regiones genómicas específicas para STEC O157 (Kudva *et al.*, 2002). En un estudio se reportó que el PFGE basado en patrones de diversidad superó la diversidad de genotipo derivado de polimorfismo

En resumen, la técnica de PFGE puede ser usada para las siguientes áreas:

1. El advenimiento de técnicas de PFGE para la resolución de grandes moléculas de ADN ha proporcionado un nuevo enfoque para el análisis de genomas bacterianos (Dempsey *et al.*, 1991). La PFGE de fragmentos de ADN obtenidos utilizando diferentes enzimas de restricción es una técnica poderosa para la resolución rápida del genoma bacteriano en un pequeño número de grandes fragmentos.
2. La PFGE de fragmentos de ADN obtenidos mediante el uso de endonucleasas producen un patrón discreto de bandas útiles para la toma de huellas digitales y mapeo físico del cromosoma (Correia *et al.*, 1994).
3. La técnica de PFGE es útil para establecer el grado de relación entre las diferentes cepas de la misma especie (Correia *et al.*, 1994).

4. PFGE ha demostrado ser un método eficaz para la estimación del tamaño del genoma y la construcción de mapas cromosómicos, así como para la caracterización de especies bacterianas (Roussel *et al.*, 1994; Basim *et al.*, 1999).
5. PFGE es una poderosa herramienta para la caracterización del genoma y ha conducido a la construcción del mapa físico de más de 180 cromosomas bacterianos (Le Bourgeois *et al.*, 1989).
6. PFGE ha demostrado ser extremadamente poderoso en el análisis de grandes moléculas de ADN a partir de una variedad de fuentes, incluyendo ADN cromosómicos intactos de hongos, protozoos y genomas específicamente fragmentados de bacterias (Basim *et al.*, 1999) y mamíferos (Smith y Cantor, 1984).
7. PFGE simplifica muchas investigaciones previamente laboriosas y hace posible muchas de las nuevas investigaciones. Esta técnica se ha utilizado ampliamente en la aplicación a todos los organismos desde bacterias a virus (Gardiner, 1991).
8. Capacidad del PFGE para construir bibliotecas de cromosomas de levaduras (YACs) (Gardiner, 1991).
9. Experimentos de PFGE se utilizan en la construcción de ratones transgénicos (Gardiner, 1991).
10. PFGE también se ha mostrado útil en el estudio del daño del ADN inducido por la radiación y reparación, organización del tamaño y variación en los centrómeros de mamíferos (Suwanto y Kaplan, 1989; Gardiner, 1991).
11. PFGE juega un papel importante en el mapeo del genoma humano (Larsen *et al.*, 1992). El mapeo físico de un cromosoma humano implica ordenar y medir las distancias entre un conjunto de marcadores de ADN que son únicas para ese

cromosoma. Dado el gran tamaño de los cromosomas involucrados (50,000-300,000 kb), PFGE es el método a seguir (Larsen *et al.*, 1992).

12. PFGE se utiliza para determinar el orden de los marcadores más precisos, el cual es posible con el análisis de ligamiento genético, y con un mapa PFGE disponibles, nuevos marcadores se puede localizar rápidamente dentro de esa región (Burmeister *et al.*, 1992).

13. Una nueva mutación puede ser asignada por la clonación del gen, seguido por análisis de restricción y la hibridación, a un conjunto de fragmentos de restricción ordenados por PFGE (Larsen *et al.*, 1992).

14. PFGE facilita en gran medida la selección precisa de grandes fragmentos de ADN para la clonación. Las enzimas de restricción que son específicas para cortar secuencias que aparecen con poca frecuencia, se utilizan para crear grandes fragmentos de ADN que luego son separados por PFGE. Esta región se recupera del gel y se clona (Gardiner, 1991).

15. PFGE permite un fácil aislamiento de los fragmentos de restricción individuales para el mapeo de restricción adicional, la inserción génica y mapeo de genes funcionales (Smith *et al.*, 1988).

1.7.5. Inmunoensayo

La mayoría de las pruebas inmunológicas disponibles actualmente detectan los antígenos O, H y Stx. Esto se realiza mediante el uso de anticuerpos dirigidos a la LPS O157, el antígeno H7, Stx1 y Stx2 (MacKenzie *et al.*, 1988). Estos anticuerpos son utilizados en una gran variedad de pruebas diagnósticas que incluyen ELISA, Aglutinación en látex y otros más que están disponibles en forma comercial (Meng y Doyle, 1998).

Para el diagnóstico del antígeno LPS O157 se pueden examinar las colonias directamente del agar SMAC o después del subcultivo; mientras que el diagnóstico del antígeno H podría requerir el pasaje a través de un medio de motilidad antes de la prueba (Feng *et al.*, 1998). En caso de las pruebas inmunológicas usadas para la detección de Stx y *E. coli* productora de toxina *Shiga*, requieren anticuerpos dirigidos contra Stx1 y Stx2 (Acheson *et al.*, 1996).

Finalmente, la inmunofluorescencia directa, es usada para el diagnóstico de la lesión por *E. coli* enteropatógena (EPEC), en el cual el diagnóstico se basa en el hallazgo de filamentos de actina, usando anticuerpos monoclonales marcados, en una muestra de biopsia donde se han observado lesiones típicas de EPEC (Cleary *et al.*, 2004).

1.7.6. Métodos de reconocimiento con ácidos nucleicos

La identificación correcta de las distintas cepas de *Escherichia coli* es crucial en estudios epidemiológicos y para el desarrollo de medidas efectivas de prevención como la vacunación. Los métodos basados en ADN para la identificación y adicional caracterización, incluyen el uso de pruebas específicas de ADN en hibridación de sondas genéticas, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Newland y Neill, 1998) y MLST.

1.7.6.1. Hibridación con sondas genéticas

La hibridación con sondas genéticas es una técnica que fue desarrollada originalmente para la investigación, e incluye el uso de una tecnología sofisticada de ADN recombinante. Esta técnica está orientada a identificar los genes de virulencia descritos para EHEC. Actualmente están disponibles sondas de ADN y de oligonucleótidos sintéticos marcados con digoxigenina o biotina; describiéndose ensayos con sondas para detectar genes de *hly*, *eae*, *stx1* y *stx2* (OIE, 2004).

1.7.6.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se han elaborado muchos protocolos de PCR múltiple para la detección de determinados genes de virulencia que caracterizan a determinadas cepas patógenas (Pass *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2004) así como la caracterización de cepas de *E. coli* causantes de diarrea en distintas especies como humanos (niños) (Agin y Wolf, 1997; Vidal *et al.*, 2004), perros (Hammermueller *et al.*, 1995), terneros (Franck *et al.*, 1998), crías de alpacas, lechones y muestras ambientales. La PCR es descrita como una reacción múltiple orientada a la amplificación e identificación de los genes que codifican los principales factores de virulencia (*stx1*, *stx2* y *eaeA*) (Osek, 2002). Así también, la PCR puede detectar y confirmar los serotipos de EHEC, STEC amplificando los genes que codifican antígenos somáticos y flagelares (Gannon *et al.*, 1997; Fratamico *et al.*, 2000).

La técnica de PCR ha sido ampliamente usada en los últimos años para detectar genes *stx*, a través de procedimientos simples dirigidos para el diagnóstico de Stx o en técnicas de PCR múltiplex incorporando *primers* para los genes *eae*, *ehx*, *uidA* o *fliC* (Cebula *et al.*, 1995; Gannon *et al.*, 1997). Es importante mencionar que la categoría patogénica está definida por la presencia de factores de virulencia de la bacteria; y que las pruebas bioquímicas como la fermentación de sorbitol y otras pruebas bioquímicas deben ser complementadas, ya que en algunos casos no se correlacionan (Kimata *et al.*, 2005; Ferens y Hovde, 2011). Actualmente, se considera que la utilización de la prueba de PCR para la detección de los genes *rfbE*, *fliC*, *eaeA*, *hlyA*, *stx1* y *stx2* determina la confirmación de *E. coli* O157:H7 (Wang *et al.*, 2002).

En muestras fecales de 51 alpacas menores de 50 días de edad, cuya muerte estuvo asociada a diarreas o presentaban signos clínicos de diarrea, se aisló *E. coli* utilizando metodología convencional y se descartó la presencia de rotavirus mediante análisis de electroforesis y coloraciones de nitrato de plata. Las cepas de *E. coli* fueron analizadas con la prueba PCR Multiplex empleando cebadores para

amplificar los genes codificantes de las toxinas Shiga 1 y 2 (*stx1* y *stx2*), toxinas termo-labiles (*lt*) y termo-resistentes a y b (*sta* y *stb*), así como genes de la intimina (*eae*) y del “*Bundle-forming Pil*” (*bfp*) (Luna *et al.*, 2012). El análisis genotípico evidenció que 58.8% (n=30) contenían genes asociados a virulencia, encontrándose 24 cepas con el gen *eae* o *bfp* (cepas potencialmente enteropatógenicas / EPEC) y seis cepas donde se amplificaron segmentos correspondientes a genes enterohemorrágicos / ECEH (*stx2*, *stx1* o ambas), pero en ninguna se logró identificar genes *lt*, *sta* o *stb* correspondientes a *E. coli* enterotoxigénicas (Luna *et al.*, 2012; Bravo de Rueda, 2006).

Como se ha mencionado, las cepas enteropatógenicas *eae* y *bfp* son productoras de diarrea debida a su capacidad de adherirse a los enterocitos, inicialmente en forma laxa, a través del producto *bfp* y, posteriormente, en una forma más fuerte que elimina (“cepillado”) a las microvellosidades intestinales a consecuencia de la proteína intimina codificada por el gen *eae* (Nataro y Kaper, 1998). Las cepas de *E. coli* enterohemorrágicas son, teóricamente, más agresivas que las EPEC a consecuencia de genes con capacidad de secretar proteínas altamente tóxicas (vero-citotoxinas) y codificadas por cualquiera de los genes *stx* (Nataro y Kaper, 1998). Interesantemente, estas cepas EHEC podrían incrementar su patogenicidad si expresaran simultáneamente genes con capacidad de adherencia productora de la intimina (Alikhani *et al.*, 2006). En el estudio de Luna *et al.* (2012), ninguna de las cepas EHEC tenía el gen *eae*; sin embargo, las lesiones intestinales de las crías muertas con historia de diarrea correspondieron mayoritariamente a enteritis hemorrágica, detectándose mayormente cepas positivas a genes *stx* (EHEC) y al gen *eae* (EPEC).

En otra investigación con 100 muestras de diarreas neonatales procedentes de cuatro establecimientos del sur del Perú se detectaron cepas similares. Dos de 94 aislados fueron cepas EPEC (*eae* y *bfp*), 10/94 cepas APEC atípicas (solamente *eae*) y 11/94 cepas EHEC (dos de ellas *eae* positivas) (Cid *et al.*, 2010). El potencial de causalidad de diarrea de estas también ha sido observado en cepas conteniendo

genes *stx1*, *stx2* y *eae* en el 20% de diarreas fatales en crías de 1-2 meses de edad (Bravo de Rueda, 2006), y en un brote de severa diarrea catarral en guanacos patagónicos cuya cepa fue genotipificada como ECEH (Mercado *et al.*, 2004).

1.7.6.3. MLST (*Multi-locus sequence typing*)

La tipificación de secuencias multilocus es un método genético con alto poder de resolución. Esta técnica está basada en fragmentos de secuenciamiento de 7 genes de 400 a 450 pb (con un alto grado de variabilidad). El análisis detecta variaciones en los diferentes *loci* y permite la identificación de microorganismos (clones) idénticos o altamente relacionados (líneas clonales o genotipos). Asimismo, existen marcadores que han permanecido estables a lo largo de la evolución y son usados para la comparación de cepas a escalas de grandes periodos o de diferentes regiones geográficas (Pérez-Losada *et al.*, 2013). El secuenciamiento permite la detección de variantes de un solo cambio en la base de datos del gen analizado. Por tanto, si ha sido calculado que 30 diferentes alelos son encontrados por locus, y 7 genes son estudiados, hasta 307 genotipos diferentes podrían ser distinguidos (Jolley y Maiden, 2014). Cada alelo es numerado considerando su presentación previa en la base de datos y cada tipo de secuencia es definida por un código de barras de siete dígitos que son únicos para los siete locis (Urwin y Maiden, 2013).

1.8. Control y prevención

Es importante la ingestión de calostro además de aumentar la resistencia específica del neonato vacunando a las madres preñadas o las crías. Las vacunas comerciales que se disponen se basan en antígenos fimbriales y/o bacterinas, pero al parecer no son muy efectivas (Ameghino y DeMartini, 1991). La gran mayoría de ellas fueron desarrolladas para la prevención de colibacilosis en cerdos.

Una vez presentada la enfermedad podrían tomarse las siguientes medidas:

- Separar a las crías enfermas y tratarlas individualmente.

- Conducir al resto del rebaño a pastos de buena calidad.
- Suministrar productos antibióticos (como sulfas) por vía oral. Por vía parenteral se puede usar Sulfatrimetoprim u oxitetraciclina de larga duración, vía subcutánea (Ameghino y DeMartini, 1991).

El tratamiento antibiótico muchas veces no da resultados esperados, en especial en crías con deficiencias de inmunoglobulinas, estas tampoco responden a la hidratación. Además de esta terapia se les puede suministrar sustancias astringentes como ácido tánico, sustancias protectoras y absorbentes intestinales como caolín, pectina, carbón, etc. También puede ayudar el suministro de sustancias acidificantes a base de lactobacillus y levaduras, lo que ayudaría a modificar el pH intestinal y restauración de la flora normal (Ameghino y DeMartini, 1991).

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Escherichia coli provenientes de crías de alpacas presentan variabilidad fenotípica y genotípica entre animales con cuadros diarreicos y animales clínicamente sanos.

2.2. Objetivos

2.2.1. General

Establecer la variabilidad fenotípica y genotípica de linajes de *Escherichia coli* aislados de heces de crías de alpacas con cuadros diarreicos y alpacas clínicamente sanas.

2.2.2. Específicos

1. Aislar e identificar *Escherichia coli* de heces de crías de alpacas con cuadros diarreicos y clínicamente sanas.
2. Determinar los antibiotipos asociados a las cepas en estudio
3. Establecer las diferencias o similitudes entre los perfiles de PFGE de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de heces de crías de alpacas con cuadros diarreicos y alpacas clínicamente sanas.

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución del estudio

El presente estudio se realizó entre los meses de diciembre de 2013 y febrero de 2014 en el Centro de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos Lachocc de la Universidad Nacional de Huancavelica (CIDCS Lachocc-UNH), ubicado en la localidad de Lachocc, suroeste de la ciudad de Huancavelica, aproximadamente a 32 km en la carretera Huancavelica – Pisco, en una zona andina subtropical, a una altitud de 4225 m.s.n.m hasta los 4850 m.s.n.m. El tamaño muestral fue obtenido basado en la fórmula según teorema del límite central considerando un mínimo de 30 muestras, colectándose en total 160 muestras, correspondientes a 90 muestras provenientes de crías con cuadros diarreicos y 60 muestras provenientes de crías clínicamente sanas. Se registraron la fecha de muestreo, sexo, edad y comunidad de procedencia seleccionando 30 crías de alpaca con cuadros diarreicos (20 machos y 10 hembras) y 30 crías clínicamente sanas (19 machos y 11 hembras) (Anexo 1).

3.2. Colección de muestras

El método de muestreo utilizó hisopos estériles, el medio de transporte Stuart, y caldo de Tripticasa Soya (Merck) como medio de enriquecimiento. Se seleccionaron a crías con cuadros entéricos y clínicamente sanas de 1 comunidad de la localidad de Lachocc de la raza Huacaya, sujetándolas a fin de poder coleccionar las muestras de heces introduciendo directamente un hisopo estéril en el recto girando el hisopo en sentido horario y antihorario durante unos 10 a 20 segundos aproximadamente. Una vez obtenidas las muestras se procedió a colocarlos en los medios de cultivo correspondientes para su posterior procesamiento en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El transporte de las muestras se realizó a 8°C.

3.3. Aislamiento microbiano

Una vez enviado al Laboratorio de referencia las muestras de hisopado rectal en los medios de transporte bacteriano (Medio Stuart), se introdujeron en un tubo de ensayo con caldo de enriquecimiento Tripticasa Soya (TSB) rotándolos firmemente sobre la pared del tubo, seguidamente se llevaron a la incubadora durante 18 a 24 horas a 37°C. Luego se cultivaron las cepas por 24 horas a 37°C en Agar MacConkey, seleccionando las colonias que para su posterior identificación bioquímica.

3.4. Identificación bioquímica

Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por pruebas bioquímicas, las cuales incluyeron pruebas de fermentación de lactosa, producción de glucosa, indol, úrea, SIM, H₂S. Fueron incluidas como parte de la identificación por pruebas bioquímicas, las pruebas de rojo metilo, Vogues Proskauer, malonato, fenilalanina, gluconato y sorbitol (INS, 2005).

3.5. Pruebas de sensibilidad antibiótica

Las pruebas de sensibilidad se realizaron por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Se inoculó una cantidad estandarizada de bacterias en solución salina (0.5 de la escala de McFarland). Los inóculos fueron sembrados con hisopos estériles dentro de los 15 minutos de preparados utilizando agar Mueller Hinton. El sembrado se realizó en tres direcciones asegurando una buena distribución del inóculo y que las zonas de inhibición sean uniformemente circulares. Luego de cinco minutos, con una pinza estéril se colocaron los discos de papel filtro impregnados con concentraciones conocidas de antibióticos. Las placas fueron incubadas por 24 h a 37 °C en aerobiosis y se midieron los halos de inhibición de desarrollo, interpretándolos de acuerdo a las tablas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). La susceptibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos se clasificaron como sensible, intermedio o resistente.

Los antibióticos (discos de sensibilidad) utilizados en los test de susceptibilidad se encuentran agrupados dentro de las familias de beta-lactámicos (fosfomicina), fluoroquinolonas (enrofloxacin, ciprofloxacina), aminoglucósidos (amikacina, gentamicina), tetraciclinas (oxitetraciclina), cefalosporinas de tercera generación (ceftriazona, ceftadizima) y antibióticos asociados (trimetoprim, nitrofurantoína). Los antibacterianos se eligieron en base a su eficacia, disponibilidad en el mercado, y toxicidad. El halo de inhibición se interpretó como cepas sensibles, intermedias o resistentes basado en el CLSI.

3.6. Detección de clonalidad por PFGE

De los 90 aislados provenientes de crías de alpaca con cuadros diarreicos y de los 60 aislados provenientes de crías de alpaca clínicamente sanas, fueron utilizados 30 aislados de cada grupo a fin de identificar clonalidad mediante la técnica de PFGE (*pulse field gel electrophoresis*), con el objetivo de obtener un patrón genético de bandas específicas, expresando las características específicas representados en un dendrograma, que permita determinar con precisión las interrelaciones genéticas entre las diferentes cepas evaluadas.

PFGE utiliza enzimas de restricción para cortar el ADN bacteriano en ciertas localizaciones conocidas como sitios de restricción. Estas enzimas se seleccionan para generar un pequeño número de piezas de ADN que se pueden separar basándose en el tamaño. Por lo general, estas piezas de ADN, o fragmentos de restricción, son grandes y necesitan seguir un tratamiento especial y ser separados para generar una huella dactilar de ADN. En primer lugar, las bacterias se cargan en una suspensión de agarosa, similar a la gelatina, a continuación, la célula bacteriana se lisa para liberar el ADN. Una vez que el ADN se libera, a continuación, la suspensión de agarosa y el ADN (también conocida como un tapón), se trata con enzimas de restricción. Los tampones tratados se cargan en un gel de agarosa y los fragmentos de restricción se separan basándose en el tamaño usando un campo eléctrico. La PFGE puede separar fragmentos de ADN de gran tamaño, para ello un

campo eléctrico que cambia constantemente de dirección para el gel se utiliza para generar una huella dactilar de ADN.

Para proceder a realizar la prueba de PFGE, primero se separarán las colonias puras para cada cepa en tubos de tripticasa soya.

3.6.1. Metodología de la técnica de PFGE

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* fueron cultivadas en agar Mac Conkey por 18 horas a 37°C y luego, estos cultivos puros fueron sembrados en agar tripticasa soya (TSA) por 14 horas a 37°C. Para el caso de los controles, se utilizó una cepa pura de *Salmonella enterica subsp. enterica* ser. *Braenderup* H9812 que fue sembrada en agar XLD y luego resembrada en TSA por 14 horas a 37°C. De estas mismas colonias resembradas se hizo una conservación a -70°C para volver al aislamiento original para casos en los que era necesario repetir el procedimiento de PFGE.

A continuación se describe con detalle cada uno de los procedimientos que se incluyen en la técnica de PFGE en base al manual de procedimientos estandarizados de Pulse Net para América Latina y el Caribe (CDC, 2013):

Etapas 1: Preparación de los bloques de agarosa (“plugs”) a partir de cultivos en agar

a) Preparación de los “plugs”

1. Se encendió el baño maría a 54-55 °C con agitación, un baño maría estacionario (55-60 °C) y el espectrofotómetro.
2. Se preparó el buffer TE (10 mM Tris: EDTA 1 mM, pH 8,0) como sigue:
 - 2.1. 10 ml de 1 M Tris, pH 8,0
 - 2.2. 2 ml de 0,5 M EDTA, pH 8,0
 - 2.3. Se diluyó 1L con Agua Reactiva Ultrapura Estéril de Laboratorio Clínico (CLRW)

3. Se preparó 1% de agarosa SeaKem Gold en tampón TE (Tris 10 mM: EDTA 1 mM, pH 8,0) para PFGE como se describe a continuación:

3.1. Pesado de 0,50 g agarosa SeaKem gold (SKG) en 250 ml en un frasco de tapa rosca.

3.2. Se añadió 50,0 ml de buffer TE 1X, agitando suavemente para dispersar la agarosa.

3.3. Se removió la tapa del frasco ligeramente, y luego se procedió a calentar en microondas durante 30 segundos; se mezcló suavemente y se repitió a intervalos de 10 segundos hasta que la agarosa se disuelva por completo.

3.4. Una vez disuelta la agarosa, se cerró la tapa del frasco y se colocó en un baño maría a 55 – 60°C y se equilibró la agarosa en el contenedor de agua durante 15 minutos o hasta que esté listo para su uso.

4. Se etiquetaron los tubos pequeños (tubos Falcon de 12 mm x 75 mm o equivalente) con los números de los cultivos.

5. Se preparó la suspensión celular buffer (100 mM Tris: EDTA 100 mM, pH 8,0) como sigue:

5.1. 100 ml de 1 M Tris, pH 8,0

5.2. 200 ml de 0,5 M EDTA, pH 8,0

5.3. Dilución en 1000 ml con agua ultrapura estéril (CLRW)

6. Se hizo la transferencia de 2 ml de buffer de suspensión celular (CSB) a pequeños tubos pequeños rotulados destinando un tubo extra como blanco. Se utilizó un hisopo de algodón humedecido con solución estéril CSB para remover parte del crecimiento de la placa de agar. Se suspendieron las células bacterianas en el tubo con buffer girando el hisopo suavemente para que las células se dispersen de manera uniforme y minimizar así la formación de aerosoles reduciéndola al mínimo. Se colocaron los tubos en hielo para evitar el crecimiento bacteriano. Finalmente, se agregaron 100 µl de cada suspensión bacteriana en cada una de las cubetas y se homogenizaron con pipeta.

7. Se ajustó la concentración de las suspensiones celulares a uno de los valores que se indican a continuación diluyendo con CSB estéril o mediante la adición de células adicionales.

7.1. Espectrofotómetro: 610 nm de longitud de onda y la absorbancia (densidad óptica) de 1,00 (intervalo de 0,8-1,0)

7.2. Medidor de turbidez Dade Microscan:

7.2.1. 0,40-0,45 (medidos en tubos Falcon 2054)

7.2.2. 0,58 a 0,63 (medida en tubos Falcon 2057)

7.3. Colorímetro bioMérieux Vitek: 17-18% de transmisión (medida en tubos Falcon 2054).

Cálculo para ajustar la concentración bacteriana:

- Volumen de suspensión:
$$\frac{200 \mu\text{l (Vol. Final)} \times 1.00 \text{ (Densidad óptica deseada)}}{\text{Densidad óptica obtenida} \times 10 \text{ (Factor de dilución)}}$$
- Volumen de buffer de suspensión:
$$(200 \mu\text{l} - \text{Volumen de suspensión})$$

Colocar en un tubo eppendorf el volumen de suspensión y el volumen de buffer de suspensiones calculadas.

Ejemplo:

- Volumen de suspensión:
$$\frac{200 \mu\text{l} \times 1.00}{0.145 \times 10} = 137.9 = 138 \mu\text{l}$$
- Volumen de buffer de suspensión
$$= 200 \mu\text{l} - 138 \mu\text{l} = 62 \mu\text{l}$$

b) Fundición de los “plugs”

1. Se rotularon los pocillos de los moldes para “plugs” con el número de cultivo.
2. Se transfirió 100 μl de suspensiones celulares ajustadas a los tubos para microcentrífuga marcados (1,5 ml).

3. Se añadió 5µl de proteinasa K (20 mg / ml) a cada tubo y se mezcló suavemente con el tip de la pipeta.
4. Se añadió 200 µl de agarosa SeaKem Gold al 1% previamente fundida para 100µl de suspensión celular; mezclando mediante pipeteo suave hacia arriba y hacia abajo 2 ó 3 veces. El exceso de pipeteado puede causar cizallamiento del ADN. Se mantuvo la temperatura de agarosa fundida, conservando el frasco en baño maría (55-60 °C).
5. Inmediatamente, se distribuyó parte de la mezcla en los pocillos de un modo reutilizable para plugs, evitando que se formen burbujas en el cargado. Dos plugs de cada muestra se pudieron hacer de estas cantidades de suspensión de células y de agarosa y son útiles si se requieren pruebas de repetición que fueron considerados para el presente estudio. Se dejó solidificar los plugs a temperatura ambiente por 10 a 15 minutos (otra opción adecuada es colocar en refrigeradora a 4°C por 5 minutos).

Etapas 2: Lisis de las células bacterianas en los “plugs” de agarosa

1. Se rotularon tubos de 50ml de polipropileno con tapón de rosca con los números de los cultivos.
2. Se preparó el buffer de lisis celular (mM Tris 50: EDTA 50 mM, pH 8,0 + 1% Sarcosilo) como sigue:
 - 2.1. 50 ml de 1 M Tris, pH 8,0
 - 2.2. 100 ml de 0,5 M EDTA, pH 8,0
 - 2.3. 100 ml de 10% Sarcosilo (N-lauroilsarcosina, sal de sodio)
 - 2.4. Se diluyó a 1000 ml con agua ultrapura estéril (CLRW)
3. Se calculó el volumen total de Lisis Celular / proteinasa K buffer necesaria como sigue:
 - 3.1. Se necesitaron 5 ml de buffer de lisis celular por cada cepa (ejemplo: 5 ml x 10 tubos = 50 ml)
 - 3.2. Se necesitaron 25 µl de proteinasa K de la solución stock (20 mg / ml) por cada cepa (por ejemplo: 25 µl x 10 tubos = 250 µl)

4. Se preparó la mezcla maestra midiendo el volumen correcto de buffer de lisis celular y proteinasa K en tubo de ensayo de tamaño o frasco apropiado y se mezcló bien.
5. Se añadieron 5 ml de proteinasa K / buffer de Lisis Celular a cada tubo rotulado de 50 ml.
6. Se añadieron los plugs a los tubos de 50 ml y se recortó el exceso de agarosa con hoja de afeitar o un instrumento similar.
7. Se retiró la cinta de molde reutilizable. Se remojó durante 15 minutos antes de lavarlos. Se desinfectaron los moldes para plugs en etanol al 90% durante 30-60 minutos.
8. Se colocaron los tubos en una gradilla y se incubaron a 54 a 55 °C en baño maría por un tiempo de 1.5-2 horas con agitación constante y vigorosa (150-175 rpm).
9. Se procedió a colocar en agua ultrapura estéril (CLRW) a 54-55 °C para que los plugs se puedan lavar dos veces con 10-15 ml de agua (200 a 300 ml por 10 tubos).

Etapas 3: Lavados de los “plugs” de agarosa después de la lisis celular

1. Se retiraron los tubos del baño maría, y se eliminó el buffer de lisis celular cuidadosamente.
2. Se añadió 10-15 ml de agua ultrapura estéril (CLRW) que había sido precalentada a 54-55 ° C a cada tubo y se agitaron los tubos en un baño maría a 54 a 55 ° C
3. Se virtió el agua de los buffers y se repitió el paso de lavado con agua precalentada (Paso 2) una vez más.
4. Pre-calentamiento suficientemente estéril de buffer TE (10 mM Tris: EDTA 1 mM, pH 8,0) en un baño maría a 54-55 ° C de modo que se pudieron lavar cuatro veces con 10-15 ml de TE 1X (400-600 ml para 10 tubos) después de iniciado el último lavado.
5. Se virtió el agua, luego se agregó 10-15 ml de buffer TE 1X precalentado (54 a 55 °C) y se agitaron los tubos en baño maría a 50°C durante 10-15 minutos.

6. Se vertió el buffer TE y se repitió el paso de lavado con buffer TE 1X estéril precalentado tres veces más.
7. Se decantó el último lavado y se agregaron 5-10 ml de buffer TE 1X estéril a cada tubo. Los plugs fueron transferidos a tubos más pequeños de 2 ml (criotubos de concentración con 1 a 2 µl de buffer TE) para el almacenamiento a largo plazo (4°C).

Etapas 4: Digestión del ADN en “plugs” de agarosa con la enzima de restricción

1. Se rotularon los tubos eppendorf de 1,5 ml con los números de las cepas; 5 tubos marcados para el control estándar *Salmonella ser. braenderup* H9812.
2. Paso de incubación pre-restricción: Se preparó una mezcla maestra mediante la dilución de 10 veces el buffer apropiado de restricción (Roche Applied Science o equivalente) 1:10 con agua ultrapura estéril (CLRW) de acuerdo con la siguiente tabla:

Reagente	µl/Trozo de plug	µl/10 Trozo de plug	µl/15 Trozo de plug
Agua ultrapura estéril	180 µl	1800 µl	2700 µl
Buffer de restricción 10X	20 µl	200 µl	300 µl
Volumen total	200 µl	2000 µl	3000 µl

3. Se añadieron 200 µl de buffer de restricción diluido (1X) a los tubos eppendorf ya rotulados con los números de los cultivos a colocar en el gel.
4. Se retiró cuidadosamente cada plug del buffer TE con una espátula y se colocaron en una placa petri estéril desechable marcada en la parte inferior con un marcador para asegurar el espesor adecuado del fragmento del plug de 2 a 2.5 mm. Se limpió la placa petri con alcohol 70%.

5. Se realizaron cortes de 2,0 a 2,5 mm de ancho de cada muestra con una hoja de bisturí y se trasladó al tubo eppendorf correspondiente que contenía el buffer de dilución de restricción ayudado con una espátula. El resto del plug se volvió a almacenar a 4°C.
 - 5.1. Se incubaron las muestras y los plugs control cortados en baño termostatzado a 37 °C durante 5-10 minutos.
 - 5.2. Después de la incubación, se removió el corte de plug del buffer utilizando una pipeta provista con un tip de 250 µl en todo el trayecto hasta la parte inferior del tubo y el buffer aspirado. Se tuvo cuidado de no dañar el pedazo de plug con la punta de la pipeta.
6. Se preparó la mezcla master enzima de restricción de acuerdo con la siguiente tabla.

Reagente	µl/Trozo de plug	µl/10 Trozo de plug	µl/15 Trozo de plug
Agua ultrapura estéril	173 µl	1730 µl	2595 µl
Buffer de restricción 10X	20 µl	200 µl	300 µl
Albúmina sérica bovina (10mg/ml)	2 µl	20 µl	30 µl
XbaI (10U/ µl)	5 µl	50 µl	75 µl
Volumen total	200 µl	2000 µl	3000 µl

7. Se añadieron 200 µl de mezcla master de enzima de restricción a cada tubo. Se cerró el tubo y se mezcló golpeando suavemente.
8. Se incubó la muestra y el plug control cortado en baño termostatzado a 37 ° C durante un mínimo de 4 horas.

Etapas 5: Preparación del gel de agarosa

1. Se confirmó que el baño maría este equilibrado a 55-60 ° C.
2. Se preparó un volumen de Tris-Borato EDTA buffer (TBE) 0.5X que se necesita tanto para el gel y corrida electroforética de acuerdo con la siguiente tabla:

Reagente	Volumen (ml)	Volumen (ml)
Stock Tris-Borato-EDTA 10X	100	110
Agua ultrapura estéril	1900	2090
Volumen total	2000	2200

3. Se preparó agarosa SeaKem Gold (SKG) al 1% en TBE 0.5X de la siguiente manera:
 - 3.1. Se pesó una cantidad apropiada de SKG en 500 ml en un frasco con tapa rosca.
 - Se mezcló 1,0 g de agarosa con 100 ml de TBE 0.5X para geles de 14cm de ancho (10 pozos).
 - 3.2. Se añadió la cantidad apropiada de 0,5X de TBE; se agitó suavemente para dispersar la agarosa.
4. Se removió ligeramente la tapa rosca y luego se introdujo en horno microondas por 60 segundos con una potencia moderada, se mezcló suavemente y se repitió por intervalos de 15 segundos hasta que la agarosa se disuelva completamente.
5. Se tapó nuevamente el frasco.
6. Un pequeño volumen (2 a 5 ml) de la agarosa Seakem Gold al 1% enfriada y derretida fueron requeridos para sellar los pozos después de cargar los plugs.
7. Una vez cumplido el tiempo de la digestión se retiraron los trozos de plugs del baño maría a 37°C. Se retiró la mezcla enzima/buffer y se añadieron 200 µl de TBE0.5X. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Se sacó el TBE 0.5X de los tubos eppendorf con una pipeta automática. Se retiraron los pedazos de plugs de los tubos con una espátula, luego se colocaron en el peine de electroforesis, cargándose en los carriles superiores de la siguiente manera:

- 8.1. Se cargaron estándares de *Salmonella* ser. *braenderup* H9812 en los carriles 1, 5, 9 (gel de 9 pocillos) o en los carriles 1, 8, 15, 22 y 29 (gel de 29 pocillos).
- 8.2. Se cargaron las muestras en los pocillos remanentes y se registraron las localizaciones.
9. Se eliminó el exceso de buffer con papel absorbente.
10. Se dejaron secar los plugs en medio ambiente y se confirmaron que los cortes de los plugs se encontraran alineados correctamente en la parte inferior de los dientes del peine, asegurándose de que los plugs se encontraran en el ras de la parte inferior de los dientes.
11. Se vertió cuidadosamente la agarosa (enfriado a 55 – 60°C) en el molde del gel y se eliminó cualquier debris que pudiesen estar presentes.

Etapas 6: Electroforesis

1. Se colocó el marco de gel negro en la cámara de electroforesis. Luego se agregó 2 – 2.2 L de TBE a 0.5X recién preparado. Se cerró la tapa de la unidad.
2. Se encendió la fuente de poder, luego la bomba de calibrado a una razón de flujo del buffer de 1 litro/minuto (velocidad de bomba= 70) y por último se encendió el módulo de enfriamiento (14°C) aproximadamente 30 minutos antes de que el gel sea corrido.
3. Se retiró el peine después de que el gel solidifica por 30 a 45 minutos.
4. Se rellenaron los pozos del gel agarosa Seakem Gold al 1%. Se destornilló y se retiraron las compuertas laterales del molde; luego, se eliminó el exceso de agarosa de los lados y de la parte de la parte inferior de la plataforma con papel absorbente. Luego se colocó cuidadosamente dentro del marco negro de la cámara de electroforesis. Por último se cerró la tapa de la cámara y se inició la corrida presionando la tecla “pause/start run”.

Se programaron las condiciones de electroforesis en base a las condiciones del equipo CHEF-MAPPER:

- Tiempo de pulso inicial: 6.76 segundos
- Tiempo de pulso final: 35.38 segundos
- Voltaje: 6 V
- Ángulo de inclinación: 120°
- Tiempo de corrida: 18 horas

Etapas 7. Tinción y documentación del gel de agarosa para PFGE – Cuidado del equipo de electroforesis

1. Una vez finalizada la corrida de electroforesis, se procedió a apagar el equipo comenzando por el módulo de enfriamiento, luego la bomba y por último la fuente de poder.
2. Con cuidado, se retiró primero el marco de la cuba electroforética y por último el gel de agarosa.
3. Se colocó el gel en la solución de tinción de bromuro de etidio. Esta solución se preparó diluyendo 40 µl de solución concentrada comercial (10 mg/ml) en 400 ml de agua destilada (para estos volúmenes es necesario un recipiente de aproximadamente 14 x 24 cm).
4. El gel se tiñó por 20 a 30 minutos en un recipiente cubierto con agitación suave para que el colorante se distribuya uniformemente en todo el gel.
5. Una vez finalizado el tiempo de tinción se procedió a la decoloración del gel transfiriendo el gel del recipiente conteniendo el bromuro de etidio a un recipiente que contuvo aproximadamente 500 ml de agua destilada. Se agitó suavemente por 30 minutos cambiándose el agua cada 10 minutos (2 lavados)
6. Mientras transcurría el tiempo de tinción y decoloración se debió seguir las siguientes pautas para el cuidado del equipo:
 - 6.1. Drenaje y descarte del buffer de la cámara de electroforesis utilizando un recipiente adecuado. Para esto se debió desconectar la tubería que

- conecta al módulo de enfriamiento, y se conectó la tubería para el vaciado de la cuba.
- 6.2. Se aseguró el completo drenaje de todo el volumen inclinando la cuba electroforética.
 - 6.3. Para el enjuague la cámara, primero se debió desconectar la tubería de drenaje y volver a conectar la tubería que conecta al módulo de enfriamiento. Luego se agregó a la cámara 2 litros de agua destilada.
 - 6.4. Se encendió la fuente de poder y la bomba, dejando funcionar a esta última por 5 a 10 minutos para que el agua circule por las tuberías a fin de eliminar el buffer remanente en el equipo.
 - 6.5. Para el drenaje del líquido de lavado del sistema de tuberías fue necesario desconectar la tubería que conecta el módulo de enfriamiento dejando funcionar la bomba hasta que no se observe líquido en el interior de las tuberías. Luego se drenó el buffer de la cuba electroforética como se detalló en el primer paso.
 7. Para la captura de la imagen de la corrida electroforética se utilizó el equipo ChemiDoc II XRS⁺ y se trabajó con el programa Quantity One.
 8. Para obtener la calidad de la imagen deseada se programaron los parámetros para captura de la imagen de acuerdo a la cámara fotográfica disponible.
 9. Se analizó en el programa GelCompar II, con un índice de correlación de 2.00 en base al coeficiente de DICE. Con el dendrograma de similitud obtenido se crearon los gráficos de dispersión de cepas con respecto a los patrones de bandas.

3.7. Materiales y reactivos

A) Toma de muestra

- Guantes quirúrgicos
- Hisopos estériles
- Medio de transporte Stuart

- Alcohol 96°
- Algodón

B) Aislamiento e identificación microbiana

- Incubadora
- Cultivo bacteriano
- Asas de siembra
- Placas petri
- Caldo Trypticase soya
- Agar sangre
- Agar Mac Conkey
- Autoclave
- Mechero
- Alcohol 96°
- Agar Citrato de Simmons
- Agar TSI
- Agar Urea de Christensen
- Caldo Malonato
- Agar Esculina
- Medio SIM
- Medio Rojo Metilo – VoguesProskauer
- Medio de cultivo de peptona
- Tiras para prueba de oxidasa
- Reactivo de Kovacs
- Reactivo de Barrit
- Peróxido de hidrógeno
- Hidróxido de potasio al 40%
- Agua oxigenada
- Portaobjetos
- Agua destilada

C) Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Los antibióticos (discos de sensibilidad) utilizados en los test de susceptibilidad se encuentran agrupados dentro de las familias de beta-lactámicos (fosfomicina), fluoroquinolonas (enrofloxacin, ciprofloxacina), aminoglucósidos (amikacina, gentamicina), tetraciclinas (oxitetraciclina), cefalosporinas de tercera generación (ceftriazona, ceftadizima) y antibióticos asociados (trimetoprim, nitrofurantoína).

D) PFGE

1) Preparación de bloques de agarosa (“Plugs”) a partir de cultivos de agar

Preparación de Agarosa

- Agarosa SEAKEM GOLD
- Buffer TE(10mM Tris: 1mM EDTA, pH:8.0)
- Baño maría a 50 – 60°C
- Balanza
- Frasco o Erlenmeyer con tapa a rosca
- Microondas

Preparación de la suspensión celular – bacteriana

- Buffer de suspensión celular
- Hisopo estéril (uno por cada aislamiento)
- Tubos eppendorf
- Pipetas automáticas
- Placa de cultivo con crecimiento de 18h a 37 grados del aislamiento a estudiar
- Cubetas para espectrofotómetro o tubos para turbidímetro
- Buffer para suspensión celular BSC (Tris 100 mM: EDTA 100mM, pH: 8.0)

- Tris 1 M, pH 8.0 -----10ml
- EDTA 0.5 M, pH 8.0 -20ml
- Agua estéril

Armado de los “plugs”

- Agarosa Seakem Gold al 1% en TE 1X
- Proteinasa K (solución de 20mg/ml conservada a -20 grados, en alícuotas de 200ul cada una, volumen necesario para 10 “Plugs”)
- Moldes para “Plugs”
- Tubos eppendorf de 1.5ml
- Suspensiones bacterianas ajustadas por turbidimetria
- Micropipeta y tips

2) Lisis de las células bacterianas en los “Plugs” de agarosa

- Tubos de polipropileno de 50ml
- Proteinasa K (Solución Stock 20 mg/ml)
- Espátula de 6mm de ancho
- Buffer de lisis celular
- Gradilla
- Baño maría a 54° C con agitación
- Preparación de Buffer de lisis celular (CSB) (Tris 50 mM: EDTA 50 mM, pH 8.0 + Sarcosyl 1%):
 Tris 1, pH 8.0.....25 ml
 EDTA 0.5 M, pH 8.0.....50 ml
 Sarcosyl 10%.....50 ml
 (N-Lauroylsarcosina sal sódica)
 Agua estéril grado molecular c.s.p. 500 ml

3) Lavado de los “Plugs” de agarosa después de la lisis celular

- Tapas perforadas o “screened caps”
- Agua calidad molecular estéril termostatzada a 50°C.
- Buffer TE 1X en baño maría a 50°C
- Baño maría a 50°C con agitación
- Criotubos de 2ml estériles para conservación de los “Plugs” en buffer TE 1X

4) Digestión del ADN en “Plugs” de agarosa con la Enzima

- “Plugs” de los aislamientos a analizar
- “Plugs” de la cepa de referencia *Salmonella ser. Braenderup*
- Tubos Ependorff estériles de 1.5 ml
- Papel tissue
- Espátula
- Placas petri
- Enzima de restricción XbaI
- Agua calidad molecular estéril
- Baño termostatzado a 37°C

5) Preparación del gel de agarosa

- Agarosa SeaKem Gold al 1%
- Buffer TBE stock 5X o 10X
- Agua calidad molecular estéril
- Matraz Erlenmeyer o frasco con tapa rosca estéril de 250 ml
- Erlenmeyer de 3000 ml
- Film de polietileno
- Probetas estériles
- Molde para armado del gel

- Tabla niveladora
- Espátula
- Balanza
- Microondas
- Baño maría a 50 – 60°C
- Guantes resistentes al calor
- Pipetas automáticas

6) Electroforesis

- Equipo de electroforesis CHEF MAPPER

7) Tinción y Documentación del gel de agarosa para PFGE – cuidado del equipo de electroforesis

- Recipiente con solución de Bromuro de Etidio
- Recipiente con Agua destilada para decolorar
- Agitador orbital
- Equipo de foto documentación
- Espátula-pala para manipulación de gel de 20 x 17 cm
- Agua destilada

3.8. Análisis de datos

Los datos provenientes de la comunidad evaluada fueron registrados por medio del programa Microsoft Office 2010. El presente estudio basó sus resultados según el criterio para muestras por conglomerados. Esto último debido a que el sistema extensivo de producción de camélidos sudamericanos se basa normalmente en agrupar animales en corrales, y estos a su vez se encuentran en pequeñas a medianas puntas distribuidas en toda una localidad. La asociación entre la susceptibilidad antimicrobiana y las condiciones sanitarias (sanas o enfermas) así

como la influencia de las variables edad y sexo fueron evaluadas mediante la prueba de Chi-cuadrado.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Cepas viables

La viabilidad de las cepas aisladas se comprobó mediante su inoculación en Agar tripticasa soya (TSA), luego incubados a 37°C por 24 horas.

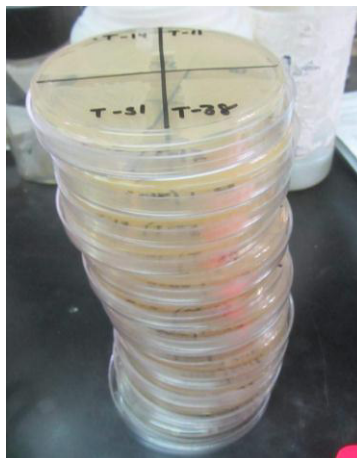


Figura 5. Placas con agar tripticasa soya (TSA) incubadas por 24 horas a 37°C donde se puede apreciar crecimiento bacteriano.

4.2. Identificación bioquímica

En base a los medios utilizados para la identificación bioquímica de cepas de *Escherichia coli*, todas las cepas resultaron con un patrón de identificación característico para la especie estudiada (Fig. 6).



Figura 6. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli* mostrando las reacciones positivas para indol (I), rojo metilo (M) y Vogues – Proskauer (V), y reacción negativa a citrato (C).

4.3. Detección de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana

Los aislados de *Escherichia coli* provenientes de animales enfermos y sanos fueron sensibles a la mayoría de los antibacterianos utilizados, con frecuencia de sensibilidad entre 60 a 95%, a excepción de la nitrofurantoína, cuyas cepas mostraron una susceptibilidad de 8.3% (Tabla 2).

Los antibióticos con mayor sensibilidad (mayor al 80%) fueron trimetoprim (95%), gentamicina (90%) y fosfomicina (85%), mientras que los mayores índices de resistencia fueron observados para nitrofurantoína (85%) (Tabla 2). Los resultados revelaron una resistencia intermedia baja (menor igual al 50%) en animales con y sin diarrea (Tablas 3 y 4).

Los resultados del análisis estadístico reveló, que de los antibióticos evaluados, sólo la ciprofloxacino, está asociado estadísticamente ($p < 0.05$) a la condición sanitaria, no habiendo influencia por las variables sexo y edad en los casos presentados (animales diarreicos y clínicamente sanos).



Figura 7. Muestra E76 del grupo de animales enfermos que muestra sensibilidad a cuatro antibióticos (fosfomicina, trimetoprim, gentamicina y ciprofloxacino) y resistencia a nitrofurantoína.

Tabla 2. Susceptibilidad antibiótica de aislados de *Escherichia coli* en crías de alpaca con y sin diarrea (n= 60)

Antibiótico	Condición					
	Sensible		Intermedio		Resistente	
	n	%	n	%	n	%
Trimetoprim	57	95	0	0	1	1.7
Gentamicina	54	90	1	1.7	1	1.7
Fosfomicina	51	85	4	6.7	4	6.7
Ceftadizima	45	75	7	11.7	6	10
Ciprofloxacino	45	75	12	20	2	3.3
Ceftriaxona	59	70	15	25	2	3.3
Oxitetraciclina	52	60	18	30	7	8.5
Amikacina	48	55	18	30	9	15
Enrofloxacin	24	40	30	50	6	10
Nitrofurantoína	5	8.3	4	7.3	51	85

Tabla 3. Susceptibilidad antibiótica de aislados de *Escherichia coli* en crías de alpaca con cuadros diarreicos (n=30)

Antibiótico	Condición					
	Sensible		Intermedio		Resistente	
	n	%	n	%	n	%
Trimetoprim	29	97.8	0	0	1	3.3
Gentamicina	28	93.5	1	3.3	1	3.3
Fosfomicina	26	87	1	3.3	4	13.3
Ciprofloxacino	25	84.8	5	16.7	0	0
Ceftadizima	23	76.1	4	13.3	3	10
Ceftriaxona	22	71.7	9	30	0	0
Amikacina	20	65.2	6	20	5	16.7

Oxitetraciclina	19	63	9	30	3	10
Enrofloxacina	13	43.3	10	33.3	2	6.7
Nitrofurantoína	3	10	3	10	24	80

Tabla 4. Susceptibilidad antibiótica de aislados de *Escherichia coli* en crías de alpaca clínicamente sanas (n=30)

Antibiótico	Condición					
	Sensible		Intermedio		Resistente	
	n	%	n	%	n	%
Trimetoprim	29	96.7	0	0	1	3.3
Gentamicina	29	96.7	0	0	1	3.3
Fosfomicina	27	90	3	10	1	3.3
Ceftadizima	24	80	3	10	3	10
Ceftriaxona	22	73.3	7	23.3	2	6.7
Ciprofloxacino	18	60	9	30	3	10
Amikacina	19	63.3	8	26.7	3	10
Oxitetraciclina	15	50	13	43.3	3	10
Enrofloxacina	10	33.3	14	46.7	6	20
Nitrofurantoína	2	6.7	1	3.3	28	93.3

4.4. Identificación e interpretación de perfiles de PFGE

Para que un método de caracterización sea considerado válido debe ser capaz de tipificar el 90% de las cepas bacterianas (Maslow *et al.*, 1993). La diferenciación de ADN cromosómico basado en la técnica de PFGE es buena, un método molecular sensible para analizar el grado de relaciones genéticas o variabilidad entre diferentes serotipos de *Escherichia coli* así como cepas del mismo serogrupo. Se han demostrado que las técnicas de tipado que se basan en información obtenida de los ácidos nucleicos son mucho más discriminatorias que las

fenotípicas para el tipaje de *Escherichia coli* y otras enterobacterias (Kawano *et al.*, 2006). Así pues, con el fin de establecer posibles relaciones entre los aislados estudiados, se realizó un análisis del genoma mediante PFGE.

4.4.1. Análisis de geles de PFGE

Todas las cepas analizadas en el presente estudio (30 aislados de animales con cuadros diarreicos y 30 aislados de animales aparentemente sanos) fueron caracterizadas mediante la técnica de PFGE, utilizando la endonucleasa de restricción XbaI. Todos los aislados resultaron tipificables, sin embargo, en dos de los aislados (17 y 27 correspondientes a animales clínicamente sanos) (Figs. 8-11) no se observaron sus patrones de bandas en dos corridas seguidas por lo que fue necesario recurrir a la adición de tiourea (0.52M) en el buffer de corrida del PFGE a fin de prevenir la degradación de ADN, permitiendo que los aislados aparentemente no tipificables sean tipificados (Fig. 12).

En la figura 10, se puede observar claramente que los patrones de bandas correspondientes a los carriles 22, 24, 29, 30, 44, 45, 46 y 60 presentan ciertas imperfecciones como proximidad muy cercana entre bandas, aumento de grosor de las bandas, ausencia de bandas, aumento considerable de la curvatura de las bandas y distorsión de las bandas producidas. Estas muestras fueron sometidas nuevamente al proceso de restricción siendo analizadas posteriormente por PFGE (Fig. 11).

Figura 8. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas genéticas entre los aislados de crías de alpaca clínicamente sanas; Carriles C: patrones de peso molecular *Salmonella Braenderup* cepa H9812, Carriles 1-3, 4-7 cepas de *E. coli* aisladas.

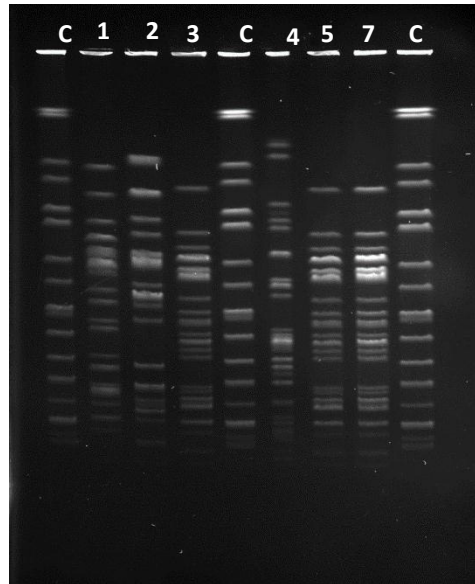


Figura 9. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas genéticas entre los aislados de crías de alpacas clínicamente sanas y enfermas; Carriles C: patrones de peso molecular *Salmonella Braenderup* cepa H9812, Carriles 6-20, cepas de *E. coli* provenientes de animales clínicamente sanos; Carriles 31-42, cepas de *E. coli* provenientes de animales enfermos. Carril 17: Cepa aparentemente no tipificable proveniente de una cría clínicamente sana.

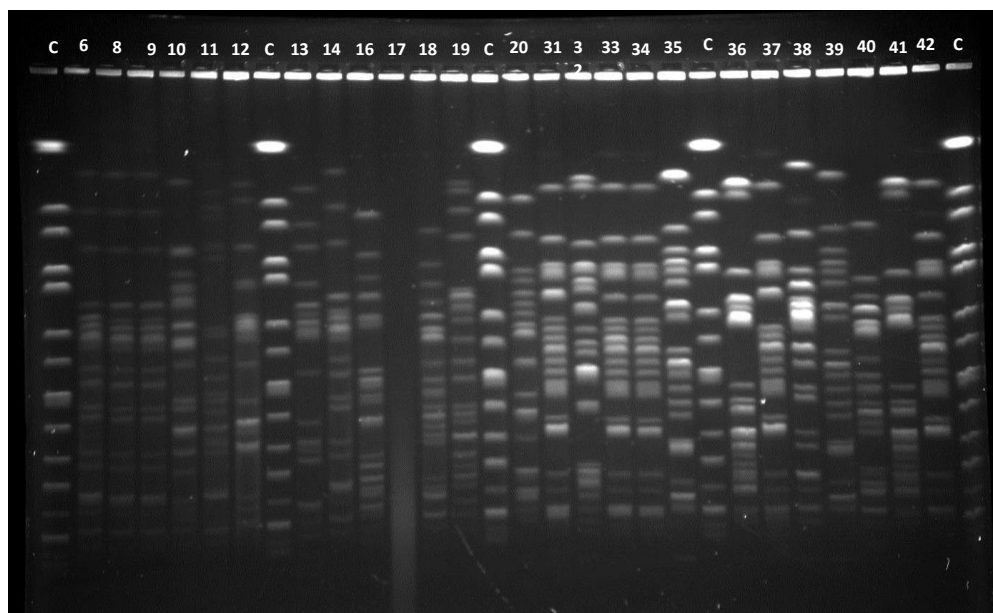


Figura 10. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas genéticas en los aislados de crías de alpacas clínicamente sanas y enfermas; Líneas C: patrones de peso molecular *Salmonella Braenderup* cepa H9812, Carriles 21-30, cepas de *E. coli* provenientes de animales clínicamente sanos; Carriles 45-59, cepas de *E. coli* provenientes de animales enfermos. Carril 27: Cepa aparentemente no tipificable proveniente de una cría sana. Las muestras 22, 24, 27, 29, 30, 44, 45, 46 y 60 fueron sometidas por segunda vez a análisis por PFGE.

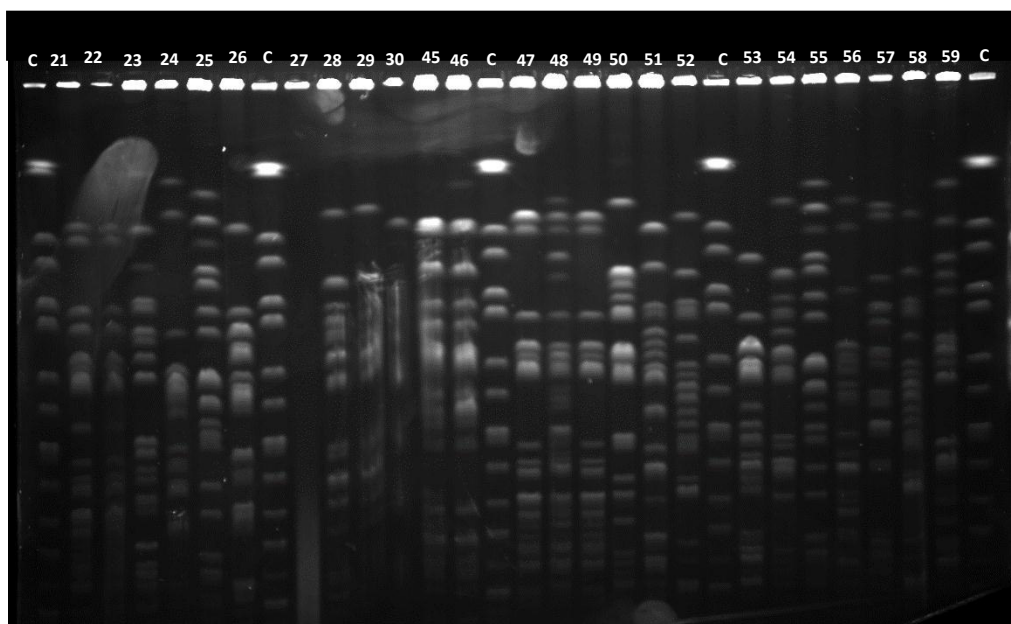


Figura 11. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas genéticas en los aislados de crías de alpacas clínicamente sanas y enfermas; Carriles C: patrones de peso molecular *Salmonella Braenderup* cepa H9812, Carriles 21-30, cepas de *E. coli* provenientes de animales clínicamente sanos; Carriles 45-59, cepas de *E. coli* provenientes de animales enfermos. Carril 27: Cepa aparentemente no tipificable proveniente de una cría sana.

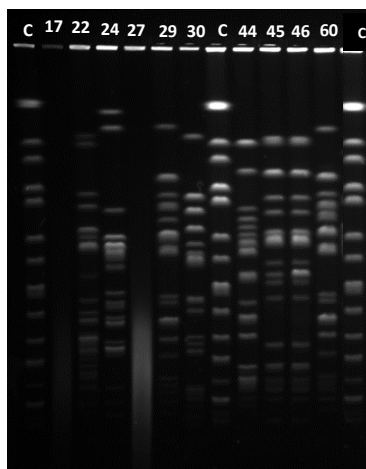
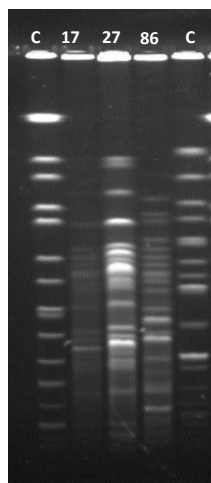


Figura 12. Gel de PFGE: representación de los distintos patrones de bandas genéticas en los aislados de crías de alpacas clínicamente sanas y enfermas; Carriles C: patrones de peso molecular *Salmonella Braenderup* cepa H9812, Carriles 17 y 27, cepas de *E. coli* post tratamiento con tiourea provenientes de animales clínicamente sanos. Nota: El carril 86 no corresponde al presente estudio.



4.4.2. Análisis de dendrogramas de similitud

En relación al presente estudio, el análisis reveló diferentes perfiles de PFGE con la enzima de restricción de XbaI. El perfil de patrones de PFGE incluyó hasta 20 fragmentos de ADN con pesos moleculares entre 20.5 y 650 Kb, y comparando cada uno de los patrones de restricción de los aislados se generó un dendrograma, pudiendo revelar cierta variabilidad entre aislados de *Escherichia coli*. Después de realizado el análisis mediante la técnica de PFGE, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 5):

Tabla 5. Resultados obtenidos mediante PFGE en aislados de crías de alpaca con cuadros diarreicos y clínicamente sanos.

PERFILES DE RESTRICCIÓN				
Número total de aislados	<i>E. coli</i> tipificados	ÚNICO	MÚLTIPLE	TOTAL DE PERFILES
60	60/60 (100%)	50/60 (83.3%)	4/60 (6.7%)	54 (90%)

Los 60 aislados del presente estudio fueron tipificados y englobados en un total de 54 patrones de restricción diferentes. Se obtuvieron 50 perfiles únicos (83.3%) (incluían un aislamiento cada uno) caracterizados por mostrar patrones de banda bien diferenciados y los 4 perfiles restantes (6.7%) fueron patrones de restricción múltiple, ya que los patrones de bandas resultaron indistinguibles e incluían más de un aislamiento (10 en total) de los 60 aislados tipificables.

En la Figura 13 se observan todos los perfiles de restricción obtenidos con la finalidad de establecer posibles relaciones genéticas entre los aislados de *E. coli* provenientes de crías clínicamente sanas. El análisis reveló la separación de dos grandes agrupaciones (I y II), identificándose dentro de estas dos grandes agrupaciones 5 *clusters* con porcentajes de similitud no menor al 75%, de los cuales,

4 *clusters* pertenecientes a la agrupación I (IB-1 y IB-2) y 1 cluster a la agrupación II (IA). Los aislados con patrones idénticos o casi idénticos de PFGE son considerados del mismo origen clonal, y basado en esta indicación, sólo 3 aislados (n° 3, 5 y 7) revelaron el mismo patrón de restricción de PFGE pertenecientes a la agrupación I (IB-2, círculo verde), considerándose indistinguibles y por tanto la misma cepa (Fig. 13).

Con respecto a los perfiles de restricción provenientes de las crías de alpaca con cuadros diarreicos, se construyó un dendrograma identificándose dos grandes agrupaciones similar a lo observado para el caso de animales clínicamente sanos (I y II), identificándose 7 *clusters* con porcentajes de similitud no menor al 80% obteniéndose 5 *clusters* para la agrupación I y 2 *clusters* correspondientes a la agrupación II (Fig. 14). Se pudo evidenciar 2 patrones de restricción múltiple, considerándose patrones de restricción indistinguibles y por tanto la misma cepa. Una de ellas agrupaba los aislados n° 45 y 46 y la otra agrupaba los aislados n° 31 y 52 (4 aislados en total), ambas pertenecientes a la agrupación I (IIB-2, círculos verdes) (Fig. 14). Asimismo, se observó un aislado por fuera perteneciente a la agrupación identificada como I (IA).

Finalmente, se realizó la construcción de un solo dendrograma para el análisis de los aislados provenientes de animales con cuadros diarreicos y clínicamente sanos (Fig. 15). Como en los casos anteriores, el análisis reveló la separación de dos grandes agrupaciones (nombradas como I y II) basadas en diferencias en sus patrones de bandas. Fueron identificados 12 *clusters* con porcentajes de similitud no menor a 85%. Para la agrupación I se identificaron 3 *clusters*, habiendo en uno de ellos dos aislados que revelaron el mismo patrón de restricción de PFGE, considerando indistinguibles y por tanto la misma cepa. Para la agrupación II, se identificaron 9 *clusters* pudiéndose observar en dos de estos aislados con el mismo patrón de bandas de restricción (IIA-círculo en verde). En el cluster n° 4 se apreciaron 2 aislados con el mismo patrón de bandas genéticas considerándose la misma cepa (31 y 52) (IIA); mientras que, en el cluster n° 10 se pudo observar tres

aislados con el mismo patrón de bandas genéticas (3, 5 y 7) (IIB-círculo en verde). Otros aislados que fueron identificados por presentar el mismo patrón de restricción fueron los aislados correspondientes a los números 2, 45 y 46 (IIA-círculo en verde).

En relación a las variables edad y sexo, se evidenció la presencia de cepas epidemiológicamente relacionadas formando *clusters* que incluían aislados provenientes de crías de diferentes edades entre los 30 días y los dos meses de edad; observándose de manera similar para la variable sexo, debido a la evidencia de clusters incluyendo de forma indistinta aislados provenientes de machos y hembras.

Figura 13. Dendrograma generado por el Software GelCompar II, mostrando la relación genética entre los aislados de *Escherichia coli* provenientes de animales clínicamente sanos producidos con la enzima de restricción XbaI. El dendrograma fue construido usando el coeficiente de Dice 2% y análisis UPGMA. El grado de similitud (%) es mostrado a escala. Punto de corte de similitud: 75%.

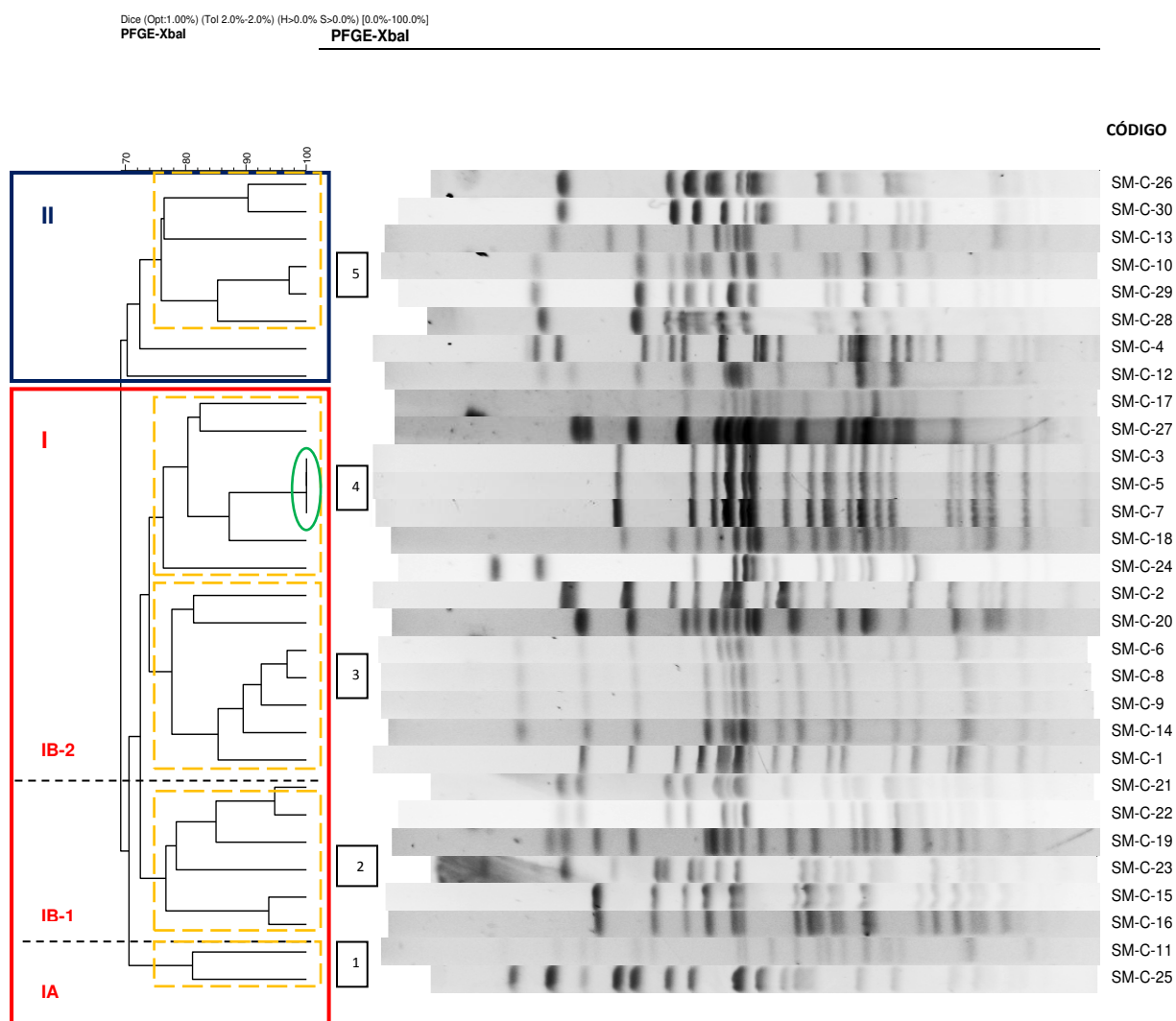


Figura 14. Dendrograma generado por el Software GelCompar II, mostrando la relación genética entre los aislados de *Escherichia coli* provenientes de animales enfermos producidos con la enzima de restricción XbaI. El dendrograma fue construido usando el coeficiente de Dice 2% y análisis UPGMA. El grado de similitud (%) es mostrado a escala. Punto de corte de similitud: 80%.

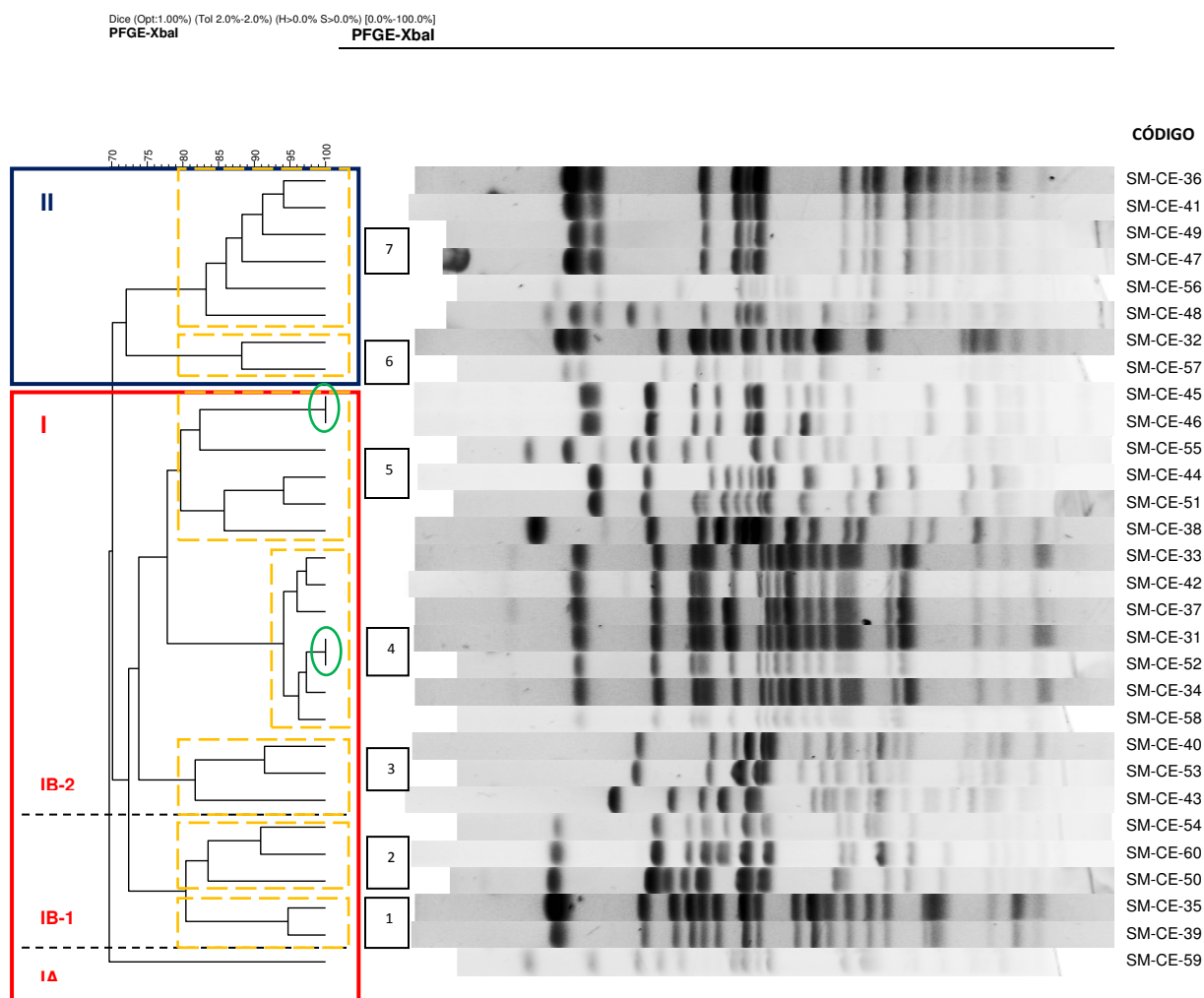
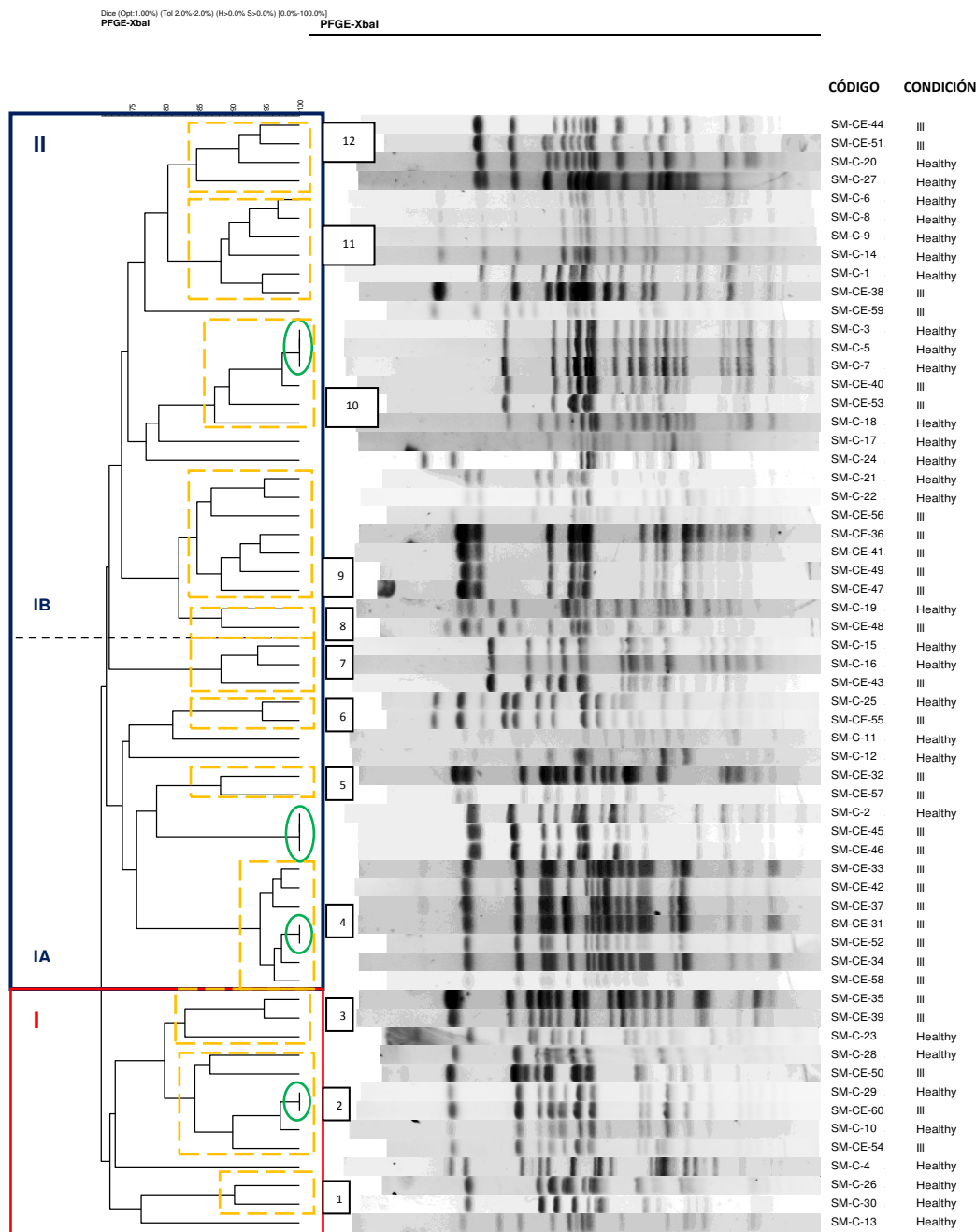


Figura 15. Dendrograma generado por el Software Gel Compar II, mostrando la relación genética entre los aislados de *Escherichia coli* provenientes de animales enfermos y clínicamente sanos producidos con la enzima de restricción XbaI. El dendrograma fue construido usando el coeficiente de Dice 2% y análisis UPGMA. El grado de similitud (%) es mostrado a escala. Condición: Healthy, saludable; III, enfermo. Punto de corte de similitud: 87%.



DISCUSIÓN

Escherichia coli es un patógeno común en casos humanos y animales, siendo *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) un agente zoonótico emergente de gran impacto a nivel mundial (Armstrong *et al.*, 1996). Los rumiantes son reservorios de EHEC O157 (Armstrong *et al.*, 1996), siendo el bovino la principal especie involucrada. Asimismo, se sabe que este serogrupo ha sido aislado de varias especies de mamíferos, aves y animales silvestres (OIE, 2014). En camélidos sudamericanos, sólo se ha reportado la presencia de *E. coli* enterohemorrágica O26:H11 en un guanaco (*Lama guanicoe*) de dos meses de edad que presentaba una diarrea acuosa (Mercado *et al.*, 2004). Es sabido que en la mayoría de animales domésticos, *E. coli* causa una diversidad de patologías, desde infecciones entéricas restringidas hasta septicemias, sustentado por el hallazgo de múltiples genes de virulencia (Mercado *et al.*, 2004; Bravo de Rueda, 2006; Luna *et al.*, 2012).

Sobre el hecho de conocer con más profundidad el papel de *E. coli* en los cuadros diarreicos, se han reportado diversos estudios en animales con signos diarreicos y clínicamente sanos, detectándose cepas patógenas en animales clínicamente sanos (Silvera *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2014). A pesar de la evidencia de información sobre patotipos y factores de virulencia hallados en animales, como los que han sido reportados en alpacas y que son potencialmente patógenos para el hombre (O’Ryan *et al.*, 2005); aun existe muy poca información concerniente al aislamiento y caracterización de cepas de *E. coli* en camélidos sudamericanos. En nuestro país, no existe información acerca de estudios de tipificación molecular de cepas de *Escherichia coli* y de ningún agente infeccioso causante de trastornos gastrointestinales en camélidos sudamericanos. Solo existe un reporte que describe la prevalencia de *E. coli* O157 de origen porcino (Osek, 2002) y escasos artículos de investigación sobre este serotipo en otros países (Beutin *et al.*, 1994; Heuvelink *et al.*, 1998; Nakazawa *et al.*, 1999). Asimismo, se ha realizado un estudio donde reportan la infección de serotipos O103, O145 y O174 de personal residentes de

granjas al ganado vacuno, justamente utilizando la técnica de PFGE para la tipificación de cepas (Heinikainen *et al.*, 2007).

El presente estudio proporciona información de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* en crías de alpacas con cuadros diarreicos y clínicamente sanas; y asimismo, información epidemiológica-molecular de cepas de *E. coli* aislados de 60 crías de alpaca (un aislado por cría) (30 crías de alpacas con cuadros diarreicos y 30 clínicamente sanas) provenientes de la provincia de Lachocc, Huancavelica, durante los meses de diciembre del año 2013 a febrero del 2014.

En relación a las pruebas de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana, se pudo observar que hubo una baja frecuencia de aislados con resistencia antimicrobiana. De los 60 aislados de *E. coli* caracterizados (30 animales con diarrea y 30 clínicamente sanos), la mayoría de las cepas, tanto de animales sanos como enfermos, mostraron susceptibilidad a los antibióticos utilizados a excepción de la nitrofurantoína que evidenció una resistencia antibiótica en el 85% de las cepas (Tabla 2). Este alto nivel de resistencia a nitrofurantoína coincide con otros estudios donde se utilizaron un mayor espectro de antibióticos contra *E. coli* (Sayah *et al.*, 2005; Salehi y Bonab, 2006). La mayoría de estudios reporta una alta sensibilidad de aislados de *E. coli* a nitrofurantoína tanto en animales como humanos, sin embargo, existen algunas investigaciones que indican una alta sensibilidad a este antibiótico en pacientes humanos con infecciones del tracto urinario, no así en animales de producción (Gales *et al.*, 2002; Fadda *et al.*, 2005).

La alta resistencia de antibióticos como la nitrofurantoína, puede explicarse por el reciente uso indiscriminado de esta droga en el campo y por la aplicación de dosis inapropiadas. Esto es sugerente, no sólo por el comportamiento similar observado tanto en aislados de animales con diarrea y sin diarrea, sino también por el patrón de susceptibilidad similar encontrado en ambos grupos, lo cual estaría indicando que la resistencia a los antibióticos utilizados en el presente estudio circulen por conjugación genética (De Francesco *et al.*, 2004).

La susceptibilidad antibiótica fue evidenciada de forma similar en animales con y sin diarrea, a excepción del ciprofloxacino, el cual mostró diferencia significativa entre ambos grupos. Altos niveles de sensibilidad fueron observados para trimetoprim (95%), gentamicina (90%), fosfomicina (85%), ceftadizima (75%), ciprofloxacino (75%), ceftriazona (70%), oxitetraciclina (60%) y amikacina (55%). Estos resultados coinciden con otros estudios de susceptibilidad antibiótica de cepas de *E. coli* patogénicas y no patogénicas en alpacas (Luna *et al.*, 2012).

De todos los antibióticos utilizados en el estudio, el único que mostró diferencias significativas en cuanto a los patrones de sensibilidad y resistencia antibiótica fue el ciprofloxacino, sugiriendo su aplicación en el tratamiento de cuadros diarreicos por *E. coli* en crías de alpaca. El ciprofloxacino es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas, la cual actúa inhibiendo la enzima bacteriana ADN girasa (topoisomerasa) que es responsable del superenrollado del ADN de modo que éste pueda enroscarse en numerosos dominios cromosómicos y sellarse alrededor de un centro de ARN (Da Silva y Hollenbach, 2010).

Estudios previos han reportado una susceptibilidad muy alta al ciprofloxacino en rumiantes (Gupta *et al.*, 2011) y asimismo, una alta efectividad bactericida *in vitro* (Chalkley y Koornhof, 1985). Por lo cual sería uno de los antibióticos más recomendados para el tratamiento de diarreas por *E. coli* en rumiantes incluyendo los camélidos sudamericanos.

En la presente investigación, las muestras fueron trabajadas para análisis genético por medio de la técnica de PFGE (*Pulse field gel electrophoresis*), prueba de oro para estudios de tipificación bacteriana, la cual se considera que presenta algunas desventajas como el largo tiempo requerido y el costo del equipo así como los costos considerables de las enzimas de restricción. El principal objetivo del presente estudio fue identificar relaciones genéticas entre aislados de ambos grupos tanto en animales con cuadros diarreicos y clínicamente sanos, así como evidenciar

relaciones genéticas entre aislados que se encontrasen entre los grupos de estudio y establecer las posibles relaciones clonales entre los grupos evaluados (crías de alpaca con cuadros diarreicos y clínicamente sanas) (Osek, 2002; Goering, 2010).

En relación a las técnicas para la tipificación de agentes microbianos. El propósito de usar sistemas de tipificación bacteriana durante investigaciones en casos de brotes es la confirmación de una relación entre cepas que sean sospechosas de estar relacionadas y la clasificación apropiada de cepas de relaciones inciertas. Una de las herramientas más importantes en la subtipificación molecular de patógenos bacterianos es la técnica de electroforesis en campos pulsados (PFGE: *Pulse field gel electrophoresis*), el cual, es un método de alto poder discriminatorio, altamente reproducible y resolutorio que utiliza enzimas de restricción que cortan el ADN bacteriano generando unos patrones de macrorrestricción genómicos o “huellas digitales” que permite establecer el grado de identidad genética entre diferentes aislamientos bacterianos epidemiológicamente relacionados, de forma que puede realizar una discriminación genotípica de las distintas poblaciones bacterianas de una especie (Tenover *et al.*, 1995; Goering, 2010).

Esta técnica es de utilidad en la vigilancia epidemiológica de diferentes agentes patógenos transmitidos por alimentos y facilita la investigación de brotes en un país integrado a una Red Regional de Subtipificación PulseNet, y así también, permite reconocer aislamientos relacionados que se derivan de la expresión clonal. La subtipificación de aislados a nivel de cepas ha sido significativamente importante de acuerdo a si los organismos están clonalmente relacionados, un ejemplo de ello es si estas cepas tienen un origen común en presuntos brotes nosocomiales o posibles eventos de transmisión cruzada (Tenover *et al.*, 1995). La tipificación mediante la técnica de PFGE ha sido demostrado ser superior a la electroforesis de enzima multilocus y a la ribotipificación para casos de discriminación entre aislados de *E. coli* y, como se ha mencionado anteriormente, ha sido usada en múltiples investigaciones epidemiológicas (Goering, 2010).

Todas las cepas analizadas en el presente estudio (30 aislados de animales con cuadros diarreicos y 30 aislados de animales clínicamente sanas) fueron caracterizadas mediante la técnica de PFGE, utilizando la endonucleasa de restricción XbaI. Esta enzima de restricción fue seleccionada, ya que, según estudios (Rice *et al.*, 1999; Renter *et al.*, 2003; Heinikainen *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2007) es la más adecuada para la caracterización de *E. coli* al producir bandas claras y bien separadas y ser los patrones de restricción fácilmente interpretables.

En el presente estudio, se utilizó una sola enzima de restricción y la cual ha sido estandarizada dentro del protocolo de PFGE para estudios de caracterización genotípica de aislados de *E. coli*, la XbaI. Esta endonucleasa de restricción, purificada del microorganismo *Xantomonas badrii*, es una endonucleasa de restricción tipo II que corta el ADN de doble cadena en el sitio de reconocimiento de 6 pares de bases 5'-T/CTAGA-3' para generar fragmentos de ADN con extremos cohesivos 5'. Esta enzima de restricción solo cortará parcialmente aislados de ADN de cepas de *E. coli* que presenten la enzima metilasa *dam* (cepas *dam*⁺), asimismo, se sabe que pueden cortar sitios de reconocimiento secundarios bajo condiciones no óptimas. En los protocolos según la base de datos de la PulseNet del Centro de Control de Enfermedades y Prevención (CDC: Centers for Disease Control and Prevention) recomienda en casos de que se obtengan patrones de restricción indistinguibles en una cantidad significativa utilizar una segunda enzima de restricción (Goering, 2010).

Es recomendable el uso de una segunda enzima para confirmar los patrones de restricción obtenido con la enzima primaria (para el presente estudio fue XbaI), dicha enzima es denominada enzima secundaria, siendo comúnmente usada la *BlnI* (*AvrII*) obtenida a partir del microorganismo *Brevibacterium linens*. Esta endonucleasa de restricción es también una nucleasa de tipo II, la cual reconoce la secuencia C/CTAGG y genera al igual que la XbaI, extremos cohesivos 5'. Es por ello que, aunque dos cepas puedan tener patrones de restricción indistinguibles después de la digestión con una endonucleasa de restricción no significa

necesariamente que estas cepas sean idénticas o relacionadas. Davis *et al.* (2003) ha sugerido que el análisis por PFGE basado en los patrones de restricción de ADN de 6 enzimas es requerido para dar una estimación adecuada de la relación entre cepas. Estudios previos han reportado que la visualización de los patrones de restricción incluso después de la digestión con 3 enzimas de restricción, demuestran que las cepas pueden originarse de múltiples fuentes, y estas fuentes pueden estar separadas por grandes distancias (Singer *et al.*, 2004).

Es sabido que hay que considerar muchos pasos dentro del protocolo de PFGE y asimismo que existen puntos críticos a los cuales deberíamos prestar atención a fin de evitar potenciales errores durante el procedimiento de la técnica, entre las que se encuentra la preparación de la suspensión celular y de los “plugs” de PFGE, lisis celular, lavado de los plugs, digestión del ADN, electroforesis en gel de ADN restringido y documentación del gel de PFGE. En relación al análisis de los geles de PFGE, se había mencionado que algunos aislados revelaron ciertas imperfecciones como proximidad muy cercana entre bandas, aumento de grosor de las bandas, ausencia de bandas, aumento considerable de la curvatura de las bandas y distorsión de las bandas producidas.

Durante el procedimiento de la técnica de PFGE se identificaron 2 aislados (17 y 27) pertenecientes al grupo de crías de alpaca clínicamente sanas, cuyas cepas no fueron revelados sus patrones de bandas en dos corridas por lo que fue necesario recurrir a la adición de tiourea (0.52M) en el buffer de corrida a fin de prevenir la degradación de ADN, permitiendo que los aislados aparentemente no tipificables sean tipificados. En el caso de los aislados no tipificables, éstos poseen enzimas *DNA-asas* que digieren el ADN en el proceso de formación de los bloques o durante su almacenamiento, por tanto, no es evidente ningún patrón de bandas. En relación a que casi la totalidad de los patrones de restricción, 50 de los 60 obtenidos (83.3%) incluyeron un único aislamiento, estos resultados revelan un buen indicativo de la elevada variabilidad o heterogeneidad existente en los aislados de crías de alpaca con cuadros diarreicos y clínicamente sanos.

El método de PFGE usado en el presente estudio mostró eficientemente polimorfismos de ADN y variabilidad entre cepas en ambos grupos (sanos y enfermos) y entre los grupos mencionados. Como se ha referido anteriormente, este es el primer estudio en camélidos sudamericanos que utiliza el PFGE para recabar información sobre caracterización genotípica de agentes patógenos involucrados en la presentación de trastornos intestinales; sin embargo, se han ejecutado este tipo de estudios en otras especies obteniendo resultados satisfactorios en el análisis molecular de serotipos de *E. coli* O157 (Heuvelink *et al.*, 1998; Osek, 2000; Osek and Gallien, 2002; Arthur *et al.*, 2007).

Según los resultados obtenidos en los dendrogramas de similitud de crías de alpaca con cuadros diarreicos, clínicamente sanas y el dendrograma donde aparecen los patrones de restricción de ambos grupos (sanos y enfermos) se observaron muy pocos casos de cepas indistinguibles (un mismo patrón de restricción) incluyendo 3 aislados con un mismo patrón de restricción dentro del grupo de crías de alpacas clínicamente sanas (3, 5 y 7); dos aislados con el mismo patrón de restricción en el cluster n°3 (31 y 52) y dos aislados en el cluster n°4 (45 y 46) en crías de alpacas con diarrea; y finalmente, 4 perfiles múltiples de restricción que abarcaron diez aislados observados en el dendrograma de similitud de crías de alpaca clínicamente sanas y enfermas (Fig. 15). Estos resultados presentan cierta similitud a lo encontrado en otros estudios de investigación (Faith *et al.*, 1996; Wetzel y LeJune, 2006) utilizando el método de PFGE como herramienta de caracterización genotípica, en cuyos casos evaluaron diferencias en los patrones de restricción del serogrupo de *E. coli* O157 en animales de granja. Ha sido reportado que para los casos del serotipo de *E. coli* O157:H7, las cepas con patrones de restricción indistinguibles han sido aislados de bovinos que se encontraban separados por largas distancias; así también para casos que involucraban sólo al serotipo O157 (Rice *et al.*, 1999; Van Donkersgoed *et al.*, 2001; Renter *et al.*, 2003). Rice *et al.* (1999) aislaron cepas de *E. coli* O157:H7 con patrones de restricción indistinguibles de múltiples granjas en el Noreste Pacífico de los Estados Unidos. Dichos autores sugirieron que el movimiento de ganado entre las granjas que fueron evaluadas era

el posible mecanismo de la transferencia de *E. coli* O157:H7; sin embargo, ellos no fueron capaces de probar definitivamente esta hipótesis. En otro estudio se identificó una baja pero significativa correlación entre la distancia geográfica y similitud genética, por lo cual concluyeron que la transmisión de cepas de *E. coli* O157:H7 ocurre incluso a distancias globales (Davis *et al.*, 2003).

Con respecto a los resultados encontrados basados en el dendrograma de similitud construido para crías de alpacas clínicamente sanas se pudo observar dos agrupaciones bien definidas (ver Fig. 13). Todos los animales que fueron muestreados pertenecían a una misma comunidad, por lo que estos animales convivían unos con otros durante todo el tiempo, habiendo un contacto íntimo entre ellos bajo un mismo sistema de crianza. Claramente se puede observar la separación entre ambos grupos, habiendo características particulares en la agrupación II lo que permite que éste se encuentre separado del grupo I en el dendrograma de similitud. Si bien es cierto, los animales estuvieron en un mismo ambiente y bajo un mismo sistema de crianza, no es posible asegurar que en el caso de las crías de alpaca pertenecientes a la agrupación II no hayan tenido un contacto mayor con otros animales que puedan tener un rol como reservorios en la epidemiología de la enfermedad, y que involucre la transmisión de cepas desde animales como bovinos (considerado el principal reservorio de *E. coli*) o rumiantes menores e incluso a partir de los humanos u otras fuentes de infección que incluyen fómites, fuente de agua, entre otros; es poco probable que esto ocurra debido al sistema de crianza realizado y a las condiciones similares a los que fueron sometidos los animales en estudio. Sin embargo, se sabe que esta agrupación está constituida por serotipos idénticos y a su vez relacionados como los serotipos O8:H8 y O6:H10 por lo que explicaría, en gran parte, esa distribución de las agrupaciones I y II en el dendrograma de similitud (Llamosas *et al.*, en prensa). Por otro lado, uno de los serogrupos (O103) que conforma la agrupación II, ha sido reportado como causal de severas enfermedades en animales y humanos, al igual que los serogrupos O26, 111 y 145 (Brooks *et al.*, 2005; Prager *et al.*, 2005). Este último dato, permite concluir que a pesar de que este serogrupo es prevalente en regiones de América Latina y es causal de severas

enfermedades en animales y humanos, los camélidos sudamericanos como las alpacas no desarrollan la enfermedad a pesar de poseer en su flora intestinal este serogrupo, habiendo la posibilidad de que esta especie cumpla un rol como reservorio de cepas de *Escherichia coli* potencialmente patógenas.

En cuanto a la presencia de patrones de restricción múltiple, fueron observados aislados con patrones de restricción idénticos de PFGE, los cuales son considerados del mismo origen clonal. Estos 3 aislados (3, 5 y 7), pertenecientes a la agrupación IB, presentaban la misma cepa de *E. coli* independientemente de su potencial patogenicidad, manteniéndose el animal clínicamente sano y sin evidencias de padecer alguna enfermedad.

Por último, una de las agrupaciones (IA) estaba constituido por un solo cluster separada claramente de los demás *clusters* que aparecen en el dendrograma de similitud (ver Fig. 13). Si bien es cierto, los animales convivían en íntimo contacto unos con otros y bajo el mismo sistema de crianza, sin embargo, se pudo determinar que los 2 aislados correspondían a 2 serotipos en particular. Uno de ellos era el serogrupo O174, considerado en el Sistema Nacional de Salud de Argentina como uno de los 4 serotipos no-O157:H7 prevalentes de impacto nacional, siendo reportado de causar severas enfermedades en animales y humanos (Brooks *et al.*, 2005; Prager *et al.*, 2005); y el otro serogrupo, del cual se tiene muy poca información es el O121. Posiblemente, ambos serogrupos hayan presentado una alta tasa de mutaciones que incluyen delecciones, inserciones, combinaciones u otro tipo de alteración génica que podrían haber ido apareciendo a lo largo del tiempo y como consecuencia la gran variabilidad de ambos serogrupos basado en las observaciones obtenidas a partir de los patrones de restricción que fueron resueltos a través del PFGE.

Con respecto a los resultados basados en el dendrograma de similitud correspondiente a las crías de alpaca con cuadros diarreicos (Fig. 14), se pudo observar, al igual que en el caso de los animales clínicamente sanos, la presencia de

dos agrupaciones claramente separadas (I y II). Si bien es cierto, los animales convivían en íntimo contacto unos con otros y bajo el mismo sistema de crianza, en el caso de los animales que presentaron cuadros diarreicos, la división de las ramas para la formación de dos agrupaciones claramente separadas evidencia, para la agrupación II, la presencia de aislados que tienen en común un mismo serogrupo (H21) (Llamosas *et al.*, en prensa) a excepción de uno de las cepas cuyo serogrupo era H25, siendo ambos serogrupos muy relacionados y a la vez ser cepas que no causan enfermedad en animales domésticos (Hussein, 2007), siendo posible que la causa de la diarrea no involucre directamente a *E. coli* como único agente causal de diarrea en estos casos en particular e intervengan otros agentes en la presentación de los cuadros diarreicos.

En el mismo dendrograma de crías de alpaca con cuadros diarreicos pudo observarse una cepa por fuera, la cual se encontraba separada completamente de los *clusters* identificados (6 *clusters* en total). En relación a la presencia de esta cepa, pudo haber divergido de las demás debido probablemente a diferencias en cuanto a factores de virulencia o tasa de mutaciones variables haciendo a esta cepa diferente a las demás, en cuyo caso, podría haberse tratado de algún patotipo diferente a los otros aislados que fueron agrupados formando *clusters* y constituyendo las dos agrupaciones identificadas en el dendrograma de similitud. Otra característica que se debe mencionar es que el serogrupo identificado para esta cepa que fue observada por fuera en el dendrograma resultó ser del serogrupo O70, que si bien es cierto este serogrupo no es un potencial patógeno causal de enfermedad en animales (Renter *et al.*, 2003), se presume que la adición de glucosa para la formación del antígeno O:70 O-PS involucra genes adquiridos individualmente que codifican una glucosiltransferasa putativa que puede ser un factor relacionado a virulencia (MacLean y Perry, 2010), pudiendo contribuir a la aparición de esta cepa por fuera en el dendrograma de similitud.

Como se había mencionado anteriormente, se pudo observar patrones de restricción múltiple conformadas por patrones de restricción indistinguibles y por

tanto se trataban de las mismas cepas, habiendo en uno de los patrones de restricción múltiple (45 y 46) los mismos serotipos; sin embargo, en el caso del otro patrón de restricción múltiple, ambos aislados fueron identificados con serotipos diferentes (Llamosas *et al.*, en prensa), por tanto, es probable que a pesar de corresponder a serotipos diferentes, que significa poseer distintos antígenos somáticos y flagelares, ambas cepas serían las mismas; sin embargo, habría la posibilidad de que no fuera tanto así debido al uso de una sola enzima de restricción sugiriendo que el análisis por PFGE basado en los patrones de restricción de ADN de 6 enzimas es requerido para incrementar la resolución de la técnica de forma que permita la diferenciación de las cepas (Davis *et al.*, 2003).

Finalmente, en relación al dendrograma de similitud construido para crías de alpacas con cuadros diarreicos y clínicamente sanas (Fig. 15), se pueden observar algunas características en particular, entre ellas tenemos: la presencia de *clusters* que incluyen animales sanos y enfermos, la existencia de cepas con porcentajes de similitud mínimo provenientes de animales sanos y enfermos en un solo cluster, presencia de cepas con patrones de restricción indistinguibles provenientes de crías clínicamente sanas y presencia de cepas con patrones de restricción indistinguibles provenientes de crías enfermas, y finalmente, la existencia de cepas con patrones de restricción indistinguibles provenientes tanto de cepas provenientes de crías de alpacas clínicamente sanas como enfermas.

Con respecto a la presencia de *clusters* conformados por crías de alpacas con cuadros diarreicos y clínicamente sanas, es probable que las cepas de *E. coli* sean transmitidas de animales enfermos a sanos o viceversa considerando el contacto tan próximo que tienen estos animales que se encuentran bajo un mismo ambiente y un mismo sistema de crianza, dicha explicación sustentaría el porcentaje de similitud mínimo tan elevado para cepas provenientes de animales enfermos y sanos; además de que en la mayoría de los *clusters* al menos una de las cepas presenta un serotipo diferente al resto. Existen otras fuentes de transmisión incluyendo animales y humanos, habiendo la posibilidad de que los animales y los humanos que trabajan

con estas especies sean en parte responsables de ser vehículos de transmisión, y así también los fómites, los cuales deberían ser considerados como vehículos de transmisión dentro de todo este marco epidemiológico relacionado a la presentación de colibacilosis en animales domésticos. Cabe mencionar que estudios previos han reportado la presencia de ciertos patotipos de *E. coli* en los ríos (Johnson *et al.*, 2003), principalmente los que se encuentran cercanos a centros de producción pecuaria, y siendo el bovino el principal reservorio de cepas EHEC, sin ser afectado por este agente más si pudiendo excretar y contaminar las aguas, puede todo ello conducir estas mismas aguas contaminadas desde diversos puntos geográficos y así mantener en circulación cepas de *E. coli* pudiendo presentarse brotes de la infección en distintas comunidades donde la crianza de animales como los camélidos sudamericanos es frecuente (Caprioli *et al.*, 2005).

En relación a la identificación de cepas con patrones de restricción indistinguibles; sin embargo, llama la atención la presencia de algunas provenientes de animales enfermos y sanos con el mismo patrón de restricción. En este caso, para el cluster 2 de la agrupación I (ver Fig. 15) un mismo serotipo y muy probablemente el mismo patotipo sería una causa potencial de diarrea en los casos encontrados en el presente estudio. Por otro lado, la presencia de patrones de restricción indistinguibles entre crías de alpaca sanas y con cuadros diarreicos que no pertenecían a un mismo serotipo, es probable que sea más de una cepa de *E. coli* el agente causal potencial de diarrea, y es lo que se muestra en la agrupación IA del dendrograma de similitud (Llamosas *et al.*, en prensa). Asimismo, podría atribuirse una posible infección mixta con otros agentes infecciosos importantes como potenciales causales de cuadros diarreicos en alpacas como *Clostridium perfringens*, *Eimeria* sp., rotavirus, *Cryptosporidium parvum*, entre los más comunes y que forman parte del complejo entérico neonatal (Rosadio *et al.*, 2012); sin embargo, no se pudo determinar la presencia de estos agentes en los casos estudiados.

En el caso de los seres humanos que trabajan con estos animales o individuos que ingresan a los centros de producción *de novo*, se sabe que son portadores y

ellos siguen eliminando bacterias sin padecer ninguna sintomatología clínica (Stephan *et al.*, 2000), asimismo, la ausencia de letrinas que pueden provocar el contacto de animales con deposiciones humanas (Sinnecker, 1976), y los niños que son positivos a algún patotipo de *E. coli*, los cuales pueden actuar como reservorio de cepas procedentes de alguna otra especie como bovino, ovino o incluso de camélidos sudamericanos (Caprioli *et al.*, 2005). Sumado a los posibles factores de riesgo que conllevan a la presentación de la enfermedad, el constante contacto de alpacas conlleva a una transmisión de cepas de *E. coli* entre animales sanos, enfermos o entre ambos grupos (Rosadio *et al.*, 2012). Es muy probable que cada uno de los factores que se han mencionado anteriormente puedan estar involucrados en la epidemiología de la enfermedad en camélidos sudamericanos del presente estudio consistente con los hallazgos que se han reportado en otros estudios que incluyen no sólo especies como camélidos sudamericanos sino también especies relacionadas como ovinos y bovinos.

Aunque la información proporcionada provee sólo un indicio de la diversidad de cepas de *E. coli*, este hallazgo es consistente con estudios recientes que han reportado un amplio rango de diversidad genética en la población de *E. coli* O157:H7 asociado a ganado bovino, donde muchos genotipos comúnmente hallados en los bovinos, y que no han sido asociados con enfermedad humana, están asociados a muy bajas frecuencias (LeJeune *et al.*, 2001; Besser *et al.*, 2001). En relación a los resultados sobre la alta variabilidad genotípica encontrada en cepas de *E. coli* provenientes de crías de alpaca, es sugerente de que el ambiente donde se encuentran los animales pueden proveer vehículos para una transmisión efectiva dada la presencia de cepas con una alta similaridad genética sin intercambio de animales (Ferens y Hovde, 2011), tal como se describen en estudios realizados en bovinos y porcinos donde se reportan un número elevado de perfiles de PFGE con bajas correlaciones entre la distancia geográfica y la similitud genética (Johnsen *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2003; Wetzel y LeJeune, 2006)

Por último, en relación a la utilización del Software GelCompar II para la construcción de los dendrogramas de similitud, es importante mencionar que toda la metodología y los pasos aplicados (puntos críticos) mediante este programa merece mucho entrenamiento y experticia por parte del que maneja este tipo de datos en un software como el mencionado sobre todo en los pasos de normalización e identificación de las bandas que serán finalmente las que conformarán cada uno de los patrones de bandas y que permitirá la construcción de los dendrogramas de similitud, ya que en el paso de normalización es importante definir el rango de peso molecular de la cepa de referencia que se esté utilizando y definir bien las bandas que se utilizarán para la comparación con los patrones de bandas resultantes a partir del procesamiento de las cepas de estudio; y asimismo, los conocimientos previos y la experticia en el manejo de los datos y en la definición de qué bandas serán marcadas y cuáles no para su posterior análisis.

En resumen, las cepas de *E. coli* fueron recuperadas de crías de alpacas provenientes de un brote de diarreas en una comunidad campesina, algunas de las cepas demostraron presentar los mismos patrones de restricción (indistinguibles) y por tanto definirlos posiblemente como las mismas cepas a pesar de que solamente fue usada la enzima primaria XbaI, debido a los altos costos de las enzimas de restricción y a la dificultad que se tuvo con el envío de la enzima utilizada en el presente estudio. Asimismo, mencionar que existe una gran variabilidad entre cepas debido al escaso número de patrones de restricción múltiple, siendo observada a través de la resolución de los geles de electroforesis y más detalladamente mediante el análisis de los dendrogramas para todos los grupos anteriormente mencionados. Finalmente, recalcar la baja variabilidad fenotípica encontrada en relación a la resistencia-sensibilidad a antibióticos de las cepas de *Escherichia coli* estudiadas y la alta resistencia a nitrofurantoína hallada tanto en animales sanos como enfermos.

CONCLUSIONES

- De la totalidad de las muestras de heces provenientes de crías de alpacas con cuadros diarreicos y clínicamente sanas analizadas en el presente estudio, se aisló e identificó 60 cepas de *Escherichia coli*.
- Las cepas de *Escherichia coli* provenientes animales con cuadros diarreicos y clínicamente sanos muestran patrones de sensibilidad y resistencia similares, con una alta resistencia a la nitrofurantoína.
- Existe alta variabilidad genotípica de *Escherichia coli* provenientes de crías de alpacas con cuadros diarreicos y clínicamente sanos.
- Existen cepas indistinguibles compartidas para casos con cuadros diarreicos y clínicamente sanos, indicando la presencia de *Escherichia coli* como flora normal en las alpacas.
- Las variables sexo y edad no influyen en la variabilidad genotípica ni fenotípica de cepas de *Escherichia coli* provenientes de crías de alpacas con cuadros diarreicos y clínicamente sanos.

RECOMENDACIONES

- Establecer un mayor tamaño muestral comprendiendo datos estadísticos como sexo, edad, comunidad de procedencia que brinden información epidemiológica molecular de los aislados de *Escherichia coli* y con ello, ayudar al mejor entendimiento e interpretación de los resultados.
- Utilizar como mínimo una segunda enzima de restricción que permita confirmar los resultados obtenidos a partir de la visualización de los patrones de restricción.
- Abarcar una mayor área geográfica considerando otras provincias del Perú a fin de que se pueda recabar una mayor información epidemiológica molecular que evidencian una posible circulación de cepas de *Escherichia coli* entre las distintas comunidades tanto a nivel local como regional.
- Considerar la posibilidad de colectar muestras fecales de otros animales y de humanos que estén en contacto frecuente con camélidos sudamericanos a fin de establecer relaciones clonales entre cepas de *E. coli* obtenidas a partir de estas especies relacionadas epidemiológicamente con la enfermedad.
- Considerar la aplicación del método de PFGE para otros agentes potencialmente patógenos causantes de morbilidad y/o mortalidad en camélidos sudamericanos, en razón de la eficiencia de la prueba para la resolución de resultados de cepas de *E. coli*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acheson DWK, Moore R, De Breucker, S, Lincicome L, Jacewicz M, Skutelsky E, Keusch GT. 1996. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun* 64: 3294-3300.
2. Agin TS, Wolf WF. 1997. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine. *Infect Immun*. 65: 320-326.
3. Alexander TJ. 1994. Neonatal diarrhea in pigs. En: C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, United Kingdom: 151-170.
4. Alfredo GT, Zhou X, Kaper JB. 2005. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 73: 18-29.
5. Alikhani MY, Mirsalehian A, Aslani MM. 2006. Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea. *J Med Microbiol* 55: 1159-163.
6. Ameghino E, DeMartini J. 1991. Mortalidad de crías de alpacas. *Bol Div IVITA*, Lima. p 71-80.
7. Angelini M, Guedes Stehling E, Moretti ML, Diasda Silveira W. 2009. Molecular epidemiology of *Shigella spp* strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. *Braz J Microbiol* 40: 685-692.
8. Arbus GS. 1997. Association of verotoxin-producing *E. coli* and verotoxin with hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 51: 91–96.
9. Armstrong GL, Hollignsworth J, Morris JG Jr. 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol Rev* 18: 29-51.
10. Arthur TM, Bosilevac JM, Brichta-Harhay DM, Guerini MN, Kalchayanand N, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. 2007. Transportation and lairage environment effects on prevalence, numbers, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on hides and carcasses of beef cattle at processing. *J Food Prot* 70:280-286.

11. Baldwin TJ, Lee-Delaunay MB, Knutton S, Williams PH. 1993. Calcium-calmodulin dependence of actin accretion and lethality in cultured HEP-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli* Infect Immun 61: 760-763.
12. Barret TJ, Kapper JB, Jerse AE, Wachsmuth IK. 1992. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. J Infect Dis. 165: 979-980.
13. Basim H, Stall RE, Minsavage GV, Jones JB. 1999. Chromosomal gene transfer by conjugation in the plant pathogen *Xanthomonas axonopodispv. vesicatoria*. Phytopathology 89: 1044-1049.
14. Bast DJ, Banerjee L, Clark C, Read RJ, Brunton JL. 1999. The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the verotoxin 1 B subunit. Mol Microbiol 32:953-960.
15. Bell CH, Kyriakides A. 1998. *E. coli*: a practical approach to the organism and its control in foods. Blackie Academic and Professional. USA.
16. Berry ED, Miller DN. 2005. Cattle feedlot soil moisture and manure content: II. Impact on *Escherichia coli* O157. J Environ Qual 34:656-663.
17. Besser TE, Hancock DD, Pritchard LC, McRae EM, Rice DH, Tarr PI. 1997. Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. J Infect Dis 175: 726-729.
18. Besser TE, Richards BL, Rice DH, Hancock DD. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. Epidemiol Infect 127: 555-560.
19. Beutin L, Aleksic S, Zimmermann S, Gleier K. 1994. Virulence factor and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *E. coli* isolated from human patients in Germany. Med Microbiol Immun 183(1): 13-21.
20. Behringer M, Miller WG, Oyarzabal OA. 2011. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. J Microbiol Meth 84: 194-201.
21. Birren B, Lai E. 1993. Pulsed Field Gel Electrophoresis: A practical guide. ed., Academic Press Inc., San Diego, California, USA.

22. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J Clin Microbiol 37: 487-503.
23. Booher SL, Cornick NA, Moon HW. 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected swine. Vet Microbiol 89: 69-81.
24. Boyd B, Lingwood C. 1989. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. Nephron 51: 207-210.
25. Bravo de Rueda C. 2006. Caracterización molecular de los genes stx1, stx2 y eae en aislados de *Escherichia coli* de crías de alpacas con diarrea. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Univ Peruana Cayetano Heredia. 73 p.
26. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. 2005. Non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection in the United States, 1983–2002. J Infect Dis 192: 1422-1429
27. Burmeister WP, Ruigrok RW, Cusack S. 1992. The 2.2 resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. EMBO J 11: 49-56.
28. Bustinza AV, Burfening PJ, Blackwell RL. 1988. Factors affecting survival in young alpacas (*Lama pacos*). J Anim Sci. 66: 1139-1143.
29. Bustinza V. 2001. La alpaca: conocimiento del gran potencial andino. Puno, Perú: Univ Nac del Altiplano. 496 p.
30. Cantey JR, Blake RK. 1997. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. J Infect Dis 135: 454-462.
31. Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res 36: 289-311.
32. Carle GF, Olson MV. 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field alternation gel electrophoresis. Nucleic Acid Research: 12: 5647-5664.
33. Cebra CK, Mattson DE, Baker RJ, Sonn RJ, Dearing PL. 2003. Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. J Am Vet Med Assoc 223: 1806-1808.

34. Cebula TA, Payne WL, Feng P. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay–multiplex PCR. J Clin Microbiol 33: 248-250.
35. [CDC] Centers of Disease Control and Prevention. 2005. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 associated with Petting Zoos-North Carolina, Florida, and Arizona, 2004 and 2005. Morbid Mortal Weekly Rept 54(50): 1277-1280.
36. Chalkley LJ, Koornhof HJ. 1985. Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. Antimicrob Agents Chemother 28(2): 331-342.
37. Chalmers RM, Aird H, Bolton FJ. 2000. Waterborne *Escherichia coli* O157. Symp Ser Soc Appl Microbiol 29:124S-132S.
38. Chapman PA, Cerdan Malo AT, Ellin M, Ashton RH. 2001. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. Int J Food Microbiol 64: 139-150.
39. Cheng X, Balendiran K, Schildkraut I, Anderson JE. 1994. Structure of PvuII endonuclease with cognate DNA. EMBO J 13: 3927-3935.
40. Chu G, Vollrath D, Davis RW. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science 234: 1582-1585.
41. Cid D, Martin-Espada C, Maturrano L, García A, Luna L, Rosadio R. 2010. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from neonatal Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea. V Simposio Europeo sobre Camélidos y otras Fibras. Sevilla, España.
42. Cizek A, Alexa P, Literak I, Hamrik J, Novak P, Smola J. 1999. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle and Norwegian rats from a large-scale farm. Lett Appl Microbiol 28: 435-439.
43. Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiol 150: 527-538.

44. Cookson AL, Woodward MJ. 2003. The role of intimin in the adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 to HEp-2 tissue culture cells and to bovine gut explant tissues. *Inter J Med Microbiol* 292: 547-553.
45. Correia A, Martin JF, Castro JM. 1994. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of amino acid producing corynebacteria: chromosome sizes and diversity of restriction patterns. *Microbiol* 140: 2841-2847.
46. Cray WC, Moon HW. 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 61: 1586-1590.
47. Davis MA, Hancock DD, Rice DH, Call DR, DiGiacomo R, Samadpour M, Besser TE. 2003. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* 95: 199-210.
48. Da Silva JM, Hollenbach CB. 2010. Fluoroquinolonas x Resistencia antibacteriana na medicina veterinaria. *Arq Inst Biol* 77(2): 363-369.
49. Dean P, Kenny B. 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* 12: 101-109.
50. Del Rosario BA, Beuchat LR. 1995. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *J Food Prot* 58: 105-107.
51. De Francesco K, Cobbold R, Rice D, Besser D. 2004. Hancock. Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks. *Vet Microbiol* 98: 55-61.
52. Dempsey JA, Livaker F, Madhure W, Snodgrass A, Cannon JG. 1991. Physical map of the chromosome of *Neisseria gonorrhoea* FA1090 with locations of genetic markers, including opa and pil genes. *J Bacteriol* 173: 5476 -5486.
53. Sonnenberg MS, Kaper JB. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60: 3953-3961.
54. Sonnenberg MS, Tacket CO, James SP, Losonsky G, Nataro JP, Wasserman SS, Kaper JB, Levine MM. 1993. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest* 92: 1412-1417.

55. Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB. 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. Trends Microbiol 5: 109-114.
56. Doyle MP, Shoeni J. 1984. Survival and growth characteristics of *E.coli* associated with hemorrhagic colitis. Appl Environ Microbiol 48(4): 855 – 856.
57. Drolet R, Fairbrother JM, Harel J, Hélie P. 1994. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. Can J Vet Res 58: 87-92.
58. Ebel F, Deibel C, Kresse AU, Guzman CA, Chakraborty. 1996. Temperature- and medium-dependent secretion of proteins by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Infect Immun 64: 4472-4479.
59. El Sayed Zaki M, El-Adrosy H. 2007. Diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, contribution of genetic amplification technique. Microb and Infect 9(2): 200-203.
60. Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, Ferry S, Holm S, Monsen T, Lundholm R, Frimodt-Moller N. 2006. Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community acquired urinary tract infection in women. Journal of Clinical Microbiology 44: 1776-1781.
61. Fadda G, Nicoletti G, Schito GC, Tempera G. 2005. Antimicrobial susceptibility patterns of contemporary pathogens from uncomplicated urinary tract infection isolated in a multicenter Italian survey: Possible impact in guidelines. J Chemother 17: 251-257.
62. Faith NG, Shere JA, Brosch R, Arnold KW, Ansay SE, Lee MS, Luchansky JB, Kaspar CW. 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. Appl Environ Microbiol 62: 1519-1525.
63. Fegan N, Desmarchelier P. 1999. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep and pre-slaughter lambs in eastern Australia. Lett Appl Microbiol 28: 335-339.
64. Feng P, Lampel KA, Karch H, Whittam TS. 1998. Genotypic and phenotypic in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. J Infect Dis 177: 1750-1753.

65. Ferens WA, Hovde CJ. 2011. *Escherichia coli* O157:H7: Animal reservoir and sources of human infectious. Foodborne Pathog Dis 8(4): 465-487.
66. Fernández-Baca. 2005. Situación Actual de los Camélidos Sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. FAO. 62 p.
67. Fischer JR, Zhao T, Doyle MP, Goldberg MR, Brown CA, Sewell CT, Kavanaugh DM, Bauman CD. 2001. Experimental and field studies of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer. Appl Environ Microbiol 67:121-1224.
68. Fischer J, Maddox C, Moxley R, Kinden D, Miller M. 1994. Pathogenicity of a bovine attaching effacing *Escherichia coli* isolates lacking Shiga-like toxins. Am J Vet Res 55: 991-999.
69. Franck SM, Bosworth BT, Moon HW. 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains from calves. J Clin Microbiol 36: 1795-1797.
70. Frankel G, Candy DC, Everest P, Dougan G. 1994. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. Infect Immun 62: 1835-1842.
71. Fratamico PM, Bagi LK, Pepe T. 2000. A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feces. Journal of Food Protection 63: 1032-1037.
72. Gales AC, Sader HS, Jones RN. 2002. SENTRY participants group (Latin America). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997–2000). Diagn Microbiol Infect Dis 44: 289-299.
73. Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 35: 656-662.
74. Gardiner K. 1991. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Analytical Chemistry 63: 658 -665.

75. Garmendia AE, Palmer GH, De Martin JC, McGuire TC. 1987. Failure of passive immunoglobulin transfer: a major determinant of mortality in newborn alpacas (*Lama pacos*). Am J Vet Res 48: 1472-1476.
76. Girón JA, Ho ASY, Shoolnik GK. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science 254: 710-713.
77. Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP, Doyle MP. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. Appl Environ Microbiol 58: 2513-2516.
78. Gómez-Couzo H, Ortega-Mora LM, Aguado-Martínez A, Rosadio-Alcántara R, Maturrano-Hernández L, Luna-Espinoza *et al.* 2011. Molecular characterization of Giardia and Cryptosporidium in alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru XXIII Internat Conf World Association for Advancement of Veterinary Parasitology. Buenos Aires, Argentina.
79. Griffin PM, Tauxe RV. 1991. The epidemiology of infectious caused by *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev 13: 60-98.
80. Griffin PM. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* In: Blaser MJ, Smith PD, Favdin JI, Greenberg RL, Guerrant (eds). Infectious of the Gastrointestinal Tract. New York: Raven Press, Ltd 739-761.
81. Goering RV. 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infect Genet Evol 10(7): 866-75.
82. Gupta N, Sharda R, Sharma V, Deshpande A, Udaykar A. 2011. Pathogenicity and antibiogram of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic cow calves. Indian J Med Microbiol 7(2): 1.
83. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. 2010. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4° ed. USA. p 267-285.
84. Halford S, Wilson DI, Daw SC, Roberts C, Wadey R, Kamath S, Wickremasinghe A, Burn J, Goodship J, Mattei MG, Moorman AF, Scambler PJ.

1993. Isolation of a gene expressed from the region of region of 22q11 commonly deleted in DiGeorge syndrome. Hum Mol Genet 2: 1577-1582.

85. Hammermueler J. *et al.* 1995. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. Can J Vet Res 59: 265-270.

86. Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Herriot DE, Tarr PI. 1997. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in fourteen cattle herds. Epidemiol Infect 118: 193-195.

87. Hancock DD, Besser TE, Gill C, Bohach. 2000. Cattle, hay, and *E. coli*. Science 284: 49-50.

88. Heuvelink AE, Van Den Biggelaar FL, De Boer E, Herbes RG, Melchers WJ, Huis HJ, Monnens LA. 1998. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. J Clin Microbiol 36: 878-882.

89. Heinikainen S., Pohjanvirta T., Eklund M., Siitonen A., Pelkonen S. 2007. Tracing Shigatoxigenic *Escherichia coli* O103, O145, and O174 infections from farm residents to Cattle. J Clin Microbiol 45 (11): 3817-3820.

90. Higgins J, Hohn C, Hornor S, Frana M, Denver M, Joerger R. 2007. Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. J Microbiol Methods 70: 227-235.

91. Huapaya B, Huguet J, Suarez V, Torres de Yón Y, Montoya Y, Salazar-Lindo E, Sakuray S, Tejada C, Gambirazio C, Gomez J. 2001. Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica en el Perú. Rev Med Exp 18: 1-2.

92. Huguet J, Huapaya B, Salazar E. 2002. Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágicas en cepas peruanas aisladas entre 1999 – 2001. Rev Peru Med Exp. Salud Pública 19(2): 63-67.

93. Hussain T. 2015. An introduction to the serotypes, pathotypes and phylotypes of *Escherichia coli*. Inter Journal Microbiol Allied Sci 2(1): 9-16.

94. Hussein HS. 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. J Anim Sci 85: E63-E72.

95. Irino K, Kato MA, Vaz TM, Ramos II, Souza MA, Cruz AS, Gomes TA, Vieira MA, Guth BE. 2005. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing

Escherichia coli (STEC) isolated from dairy cattle in Sao Paulo state Brazil. Vet Microbiol 105: 29-36.

96. Jackson SG, Goodbrand RB, Johnson RP, Odorico VG, Alves D, Rahn K, Wilson JB, Welch MK, Khakhria R. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm Epidemiol Infect 120: 17-20.

97. Jenkins C, Chart H, Cheasty T, Willshaw GA, Pearce MC, Foster G, Gunn GJ, Smith HR, Dougan G, Synge BA, Frankel G. 2002. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 from Scottish cattle. Vet Rec 15: 58-60.

98. Jo MY, Kim JH, Lim JH, Kang MY, Koh HB, Park YH, Yoon DY, Chae JS, Eo SK, Lee JH. 2004. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. Int J Food Microbiol 95: 41-49.

99. Johnsen G, Wasteson Y, Heir E, Berget OI, Herikstad H. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. Int J Food Microbiol 65: 193-200.

100. Johnson JYM., Thomas JE, Graham TA., Townshend I, Byrne J, Selinger LB, Gannon VP. 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in surface waters of southern Alberta and its relation to manure sources. Can J Microbiol 49: 326-335.

101. Jolley KA, Maiden MC. 2014. Using MLST to study bacterial variation: prospects in the genomic era. Future Microbiol 9: 623-630.

102. Karmali MA. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 2: 15-18.

103. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2: 123-140.

104. Karch H, Meyer T, Russmann H, Heeseman J. 1992. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. Infect Immun 8(60): 3464-3467.

105. Karch H, Janetski-Mittman C, Aleksic S, Datz M. 1996. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains from patients with hemolytic-

uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods and direct culture. J Clin Microbiol 34: 516-519.

106. Karpman D, Connell H, Svensson M, Sheutz F, Alm P, Svamborg C. 1997. The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* O157:H7 infection. J Infect Dis 175: 611-620.

107. Kawano M, Yaguchi K, Osawa R. 2006. Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chicken with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. Microbiol and Immun 50(12): 961-966.

108. Keene WE, Hedberg K, Herriott DE, Hancock DD, McKay RW, Barret TJ, Fleming DW. 1997. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infectious caused by commercially distributed raw milk. J Infect Dis 176: 815-818.

109. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinsheid DJ, Frey EA, Finlay BB. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell 91: 511-520.

110. Kimata K, Shima T, Shimizu M, Tanaka D, Isobe J, Gyobu Y, et al. 2005. Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. Microbiol Immunol 49: 485-492.

111. Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. 2000. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. Emerg Infect Dis 6: 458-465.

112. Kobayashi H, Shimada J, Nakazawa M, Morozumi T, Pohjanvirta T, Pelkonen S, Yamamoto K. 2001. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. Appl Environ Microbiol 67: 484-489.

113. Kudva IT, Evans PS, Perna NT, Barrett TJ, Ausubel FM, Blattner FR. 2002. Strains of *Escherichia coli* O157:H7 differ primarily by insertions or deletions, not single-nucleotide polymorphisms. J Bacteriol. 184:1873-1879.

114. Lai E, Birren BW, Clark SM, Simon MI, Hood L. 1989. Pulsed Field Gel Electrophoresis. Biotechniques 7: 34-42.

115. Larsen CS, Schoeninger MJ, van der Merwe NJ, Moore KM, Lee-Thorp JA. 1992. Carbon and nitrogen stable isotopic signatures of human dietary change in the Georgia Bight. Am J Phys Anthropol 89: 197-214.

116. Law D, Kelly J. 1995. Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like toxin-producing *E. coli* serogroups. *Infect Immun* 63: 700-702.
117. Le Bourgeois P, Mata M, Ritzenthaler P. 1989. Genome comparison of *Lactococcus* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* 59, 65-70.
118. LeBlanc JJ. 2003. Implication of virulence factors in *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* 29: 277-296.
119. LeJeune JT, Besser TE, Hancock DD. 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl Environ Microbiol* 67: 3053-3057.
120. Levine MM. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155: 377-389.
121. Leyer GJ, Wang LL, Johnson EA. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl Environ Microbiol* 61: 3752-3755.
122. Llamasas M, Morales S, Navarro A, Vásquez M, Barrios-Arpi M, Lucas J, Rodríguez J, Lira B. Serotipificación de cepas de *Escherichia coli* aisladas de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con diarrea en Cerro de Pasco. *Rev Inv Vet Perú*. (en prensa).
123. Luna L, Maturrano L, Rivera H, Zanabria V, Rosadio R. 2012. CGenotipificación, evaluación *in vitro* y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet Perú* 23: 280-288.
124. Lyhs U, Ikonen I, Pohjanvirta T, Raninen K, Mäkela PP, Peikonen S. 2012. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in Poultry Meat Products on the Finnish Retail Market. *Acta Veterinaria Scandinavica* 54: 64.
125. MacLean LL, Perry MB. 2010. Characterization of the antigenic O-polysaccharide produced by *Escherichia coli* serotype O:70. *Carbohydr Res* 345(5): 644-648.
126. MacKenzie KF, Singh KK, Grown AD. 1988. Water stress plating hypersensitivity of yeast: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 134: 1661-1666.

127. Madara JL, Patapoff TW, Gillece-Gastro B, Colgan SP, Parkos CA, Delp C, Mrsny RJ. 1993. 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *J Clin Invest* 91: 2320-2325.
128. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2006. Brock. Biología de los microorganismos. 10° ed. Ed. Pearson Educación. Madrid. España.
129. Manjarrez-Hernandez HA, Baldin TJ, Williams PH, Haigh R, Knutton S, Aitken A. 1996. Phosphorylation of myosin light chain and distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 64: 2368-2370.
130. March SB, Ratman S. 1986. Sorbitol-Mac Conkey medium for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol* 23: 869-872.
131. Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. 1993. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In DH Persing, TH Smith, FC Tenover, TJ White (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, American Society for Microbiology, Washington, p. 563-572.
132. Maule A. 2000. Survival of verocytotoxigenic *E. coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symposium Series of the Society of Applied Microbiology* 31: 296-301.
133. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffre A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth BE, Masana MO, Cataldi A, Rodriguez HR, Rivas M. 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steer from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol* 96: 189-198.
134. Melton-Celsa AR, O'Brien AD. 1998. Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals In: Kaper JB and O'Brien (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p 121-128.
135. Meng, J, Doyle, M.P. 1998. *Escherichia coli* O157: H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. In *Microbiology of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli in Foods*, ed. Kaper, J. B. and O'Brien, A.D. Washington, DC: American Society for Microbiology.p 92-108.

136. Mercado EC, Rodriguez S, Elizondo A, Marcoppido G, Parreño V. 2004. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from a South American camelid (*Lama guanicoe*) with diarrhea. J Clin Microbiol 42: 4809-4811.
137. Mora A, León S, Blanco M, Blanco JE, López C, Dabhi G, Echeita A, *et al.* 2007. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Perú). Int Food Microbiol 114: 204-210.
138. Mori L, Perales R, Rodriguez J, Shiva C, Koga Y, Choquehuanca G, Palacios C. 2014. Molecular Identification of Shiga-Toxin Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in Diarrheic and Healthy Young Alpacas. Adv Microbiology 4: 360-364.
139. Nakazawa M, Akiba M, Sameshime T. 1999. Swine as a potential reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. Emerg Infect Dis 5: 833-834.
140. Nascentes Galvão N, Chiarini E, Destro MT, de Aguiar Ferreira M, Nero LA. 2012. PFGE characterization and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. Meat Science 92: 635-643.
141. Nasonova ES. 2008. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, instruments and application. Cell and Tissue Biology 2: 557-565.
142. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11: 142-201.
143. Newland JW, Neill RJ. 1998. DNA probes for Shiga like toxin I and II and for toxin-converting bacteriophages J Clin Microbiol, 26: 1292-1297.
144. Nicolet J. 1986. Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. Edit. Acribia S.A. Zaragoza. España.
145. Nielsen EM, Tegtmeier C, Andersen HJ, Groenbaek C, Andersen JS. 2002. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. Vet Microbiol 88: 245-257.
146. Nguyen Y, Sperandio V. 2012. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol 2: 90.

147. Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 852-856.
148. Ochman H, Jones IB. 2000. Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *EMBO* 19(24): 6637-6643.
149. [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2014. *Escherichia coli* verotoxigenica. Manual de la OIE sobre animals terrestres. Cap. 2.10.13. [Internet], [13 marzo 2009].
150. Olive DM, Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-Based Typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661-1669.
151. O'Loughlin EV, Robins-Browne RM. 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxin on eukaryotic cells. *Microbes Infect* 3: 493-507.
152. Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, Brown DJ. 1994. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* documented by IS200-, ribo-, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and RFLP typing. *J Med Microbiol* 40: 15-22.
153. O'Ryan M, Prado V, Pickering LK. 2005. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis* 16: 125-36.
154. Orden JA, Ruiz-Santa-Quiteira JA, Cid D, García S, La Fuenten DE. 1999. Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrheogenic dairy calves. *Vet Microbiol* 66 (4): 265-273.
155. Osek J. 2000. Clonal analysis of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 186: 327-331.
156. Osek J. 2002. Rapid and specific identification of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in faeces by multiplex PCR. *Lett Appl Microbiol* 34: 304 - 310.
157. Osek J, Gallien P. 2002. Molecular analysis of *Escherichia coli* O157 strains isolated from cattle and pigs by the use of PCR and pulsed-field gel electrophoresis methods. *Vet Med (Praha)* 47:149-158.
158. Pass MA, Odedra R, Batt RM. 2000. Multiplex PCR for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol* 38: 2001-2004.

159. Paton JC, Paton AW. 1998. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev 11: 450-479.
160. Percival LS, Yates VM, William D, Chalmers R, Nocholas G. 2014. Microbiology of Waterborne Diseases. 2° ed. Ch. 6: 89-106.
161. Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. Infect Genet Evol 16: 38-53.
162. Prager R, Annemuller S, Tschape H. 2005. Diversity of virulence patterns among shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases-need for more detailed diagnostics. Int J Med Microbiol 295: 29-38.
163. PulseNet. 2013. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. PNL05 Last Updated.
164. Quinn PJ, Markey BK. 2005. Elementos de Microbiología Veterinaria. 1° ed. Acirbia SA. pp 290.
165. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982 – 2002. Emerg Infect Dis 11: 603-609.
166. Renter DG, Sargeant JM, Oberst RD, Samadpour M. 2003. Diversity, frequency and persistence of *Escherichia coli* O157 strains from range cattle environments. Appl Environ Microbiol 69: 542-547.
167. Rice DH, McMenamin KM, Pritchett LC, Hancock DD, Besser TE. 1999. Genetic subtyping of *Escherichia coli* O157 isolates from 41 Pacific Northwest USA cattle farms. Epid Infect 122: 479-484.
168. Rímac R. 2015. Detección de cepas patógenas de *Escherichia coli* en alpacas neonatas y niños pastores. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 74 p.
169. Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD. 2006. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. Proc Nat Acad Sci USA 103: 9667-9672.

170. Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna L. 2012. El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Rev Inv Vet Perú* 23(3): 261-271.
171. Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid D, Mills D, Finlay BB. 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J* 15: 2613-2624.
172. Roussel Y, Rebay M, Guedon G, Simone J, Decaris B. 1994. Physical and genetic map of *Streptococcus thermophilus* A054. *J Bacteriol* 176: 7413 -7422.
173. Sánchez S, McCrackin Stevenson MA, Hudson CR, Maier M, Buffington T, Dam Q, Maurer JJ. 2002. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *J Clin Microbiol* 40: 3586-3595.
174. Sargeant JM, Hafer DJ, Gillespie JR, Oberst RD, Flood SJ. 1999. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white –tailed deer sharing rangeland with cattle. *J Am Med Assoc* 215: 792-794.
175. Savkovic SD, Koutsouris A, Hecht G. 1996. Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. *Infect Immun* 64: 4480-4487.
176. Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller RA. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface Water. *Appl Environ Microbiol* p 1394-1404.
177. Schwartz DC, Cantor CR. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
178. Schmidt H, Beutin L, Karch H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 63: 1055-1061.
179. Schmidt H, Karch H. 1996. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 34: 2364-67.
180. Sears CL, Kaper JB. 1996. Enteral bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 60: 167-2015.

181. Shere JA, Bartlett KJ, Kaspar CW. 1998. Study longitudinal of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 64: 1390-1399.
182. Silvera EC, Perales R, Rodriguez J, López T, Gavidia C, Agapito J, Palacios C. 2012. Presencia de *Escherichia coli* O157 en crías de alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 23(1): 98-104.
183. Sinclair JF, Dean-Nystrom EA, O'Brien. 2006. The established intimin receptor Tir and the putative eukaryotic intimin receptors nucleolin and beta 1 integrin localize at or near the site of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence to enterocytes *in vivo*. *Infect Immun* 74: 1255-1265.
184. Singer RS, Sisco WM, Carpenter TE. 2004. Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 42: 5502-5511.
185. Sinnecker H. 1976. The basic epidemic or epizootic process. In: *General Epidemiology*. John Wiley & Sons Ltd. London. England. pp 73-84.
186. Slutsker L, Ries AA, Greene KD, Wells JG, Hutwagner L, Griffin PM. 1997. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. *Ann Intern Med*. 126: 505-513.
187. Smith, CL, Klico SR, Cantor CR. 1988. Pulsed-field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. In *Genome Analysis: A Practical Approach* pp. 41-72. Edited by K Davies. Oxford: IRL Press.
188. Staats JJ, Chengappa MM, DeBey MC, Fickbohm B, Oberst RD. 2003. Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin and enterotoxin (est A and elt) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. *Vet Microbiol* 94: 303 – 312.
189. Stein MA, Mathers DA, Yan H, Baimbridge KG, Finlay BB. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli* markedly decrease the resting membrane potential of Caco-2 and HeLa human epithelial cells. *Infect Immune* 64: 4820-4825.
190. Stephan R, Raguetti S, Untermann F. 2000. Prevalence and Characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. *J Appl Microbiol* 33: 335-341.

191. Stevens MP, van Diemen PM, Dziva F, Jones PW, Wallis TS. 2002. Options for the control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. Microbiol 148: 3767-3778.
192. Stewart G, Furst A, Avdalovic N. 1988. Transverse alternating field electrophoresis (TAFE) Biotechniques 6: 68-73.
193. Strockbine NA, Wells JG, Bopp CA, Barrett TJ. 1998. Overview of detection and subtyping methods, p 331-356. In: Kaper JB and O'Brien AD (eds) *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E.coli* strains. ASM Press, Washington, DC.
194. Suwanto A and Kaplan S. 1989. Physical and genetic mapping of the Rhodobacter sphaeroides 2.4.1. Genome: Genome size, fragment, identification and gene localization. J Bacteriol 171: 5840-5849.
195. Swaminathan B. 2001. *Listeria monocytogenes* In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. (Eds). Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p 383-409.
196. Taneja N, Sangar G, Chowdhury G, Ramamurthy T, Mishra A, *et al.* 2012. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* causing outbreaks and sporadic cholera in northern India. Indian J Med Res 136: 656-663.
197. Tarr PI, Neill MA. 2001. *Escherichia coli* O157:H7. Gastroenterol Clin North Amer 30: 735-751.
198. Tauschek M, Strugnell RA, Robins-Browne RM. 2002. Characterization and evidence of mobilization of the LEE pathogenicity islands of rabbit-specific strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol 44: 1533-1550.
199. Taylor JD, Halford SE. 1989. Discrimination between DNA sequences by the EcoRV restriction endonuclease. Biochemistry 28: 6198-6207.
200. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33: 2233-2239.
201. Thorpe CM. 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Clin Infect Dis 38: 1298-1303.

202. Torres AG, Kaper JB. 2002. Pathogenicity islands of intestinal *E. coli* In: Current Topics in Microbiology and Immunology 264: 31-48.
203. Torres AG, Payne SM. 1997. Haem iron-transport system enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol 23: 825-833.
204. Tsuji T, Watanabe K, Miyama A. 1995. Monomer of the B subunit of the heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* has little ability to bind to GM1 ganglioside compared to its coligenoid. Microbiol Immunol 39: 817-819.
205. Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, Henderson IR. 2006. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli* FEMS. Microbiol Lett 263: 10-20.
206. Urwin R, Maiden MC. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol 11: 479-487.
207. Vadillo MS; Píriz DS, Mateos YE. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. España. McGraw-Hill Interamericana. España. 653p.
208. Van Donkersgoed J, Berg JL, Potter A, Hancock DD, Besser TE, Rice DH, LeJeune JT, Klashinsky S. 2001. Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. Can Vet J 42:714-720.
209. Vidal P, Vidal M, Lagos R, Levine M, Prado V. 2004. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli* J Clin Microbiol 42: 1787-1789.
210. Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Mora A. *et al.* 2006. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with post weaning diarrhea in Slovakia. BMC Veterinary Research 2: 10.
211. Wang G, Clark CG, Rodgers FG. 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components if the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. J Clin Microbiol 40: 3613-3619.
212. Wasteson, 2001. Zoonotic *Escherichia coli*. Acta Vet Scand 95: 64-79.
213. Wetzal, LeJeune JT. 2006. Clonal dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 subtypes among dairy farms in northeast Ohio. Appl Environ Microbiol 72: 2621-2626.

214. Zheng H, Jing H, Wang H, Xia S, Cui S, Bi Z, Yang J, Pang B, Zhao G, Zhang J, Li H, Xu J. 2005. *Stx2 vha* is the dominant genotype of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from patients and domestic animals in three regions of China. Microbiol Immunol 49(12): 1019-1026.
215. Wernery U. 2001. Camelid immunoglobulins and their importance for the newborn: a review. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 48: 561-568.
216. Salehi TZ, Bonab SF. 2006. Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz Province, Iran. International Journal of Poultry Science 5(7): 677-684.
217. Zhu C, Hrel J, Jacques M, Desautels C, Donnenberg MS, Beaudry M, Fairbrother JM. 1994. Virulence properties and attaching – effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. Infect Immun 62: 4153-4159.

ANEXOS

Anexo 1. Base de datos de las crías de alpaca seleccionadas para el estudio

Número	Código	Edad	Sexo	Condición
1	SM-C-1	1 mes	Macho	Sano
2	SM-C-2	2 meses	Hembra	Sano
3	SM-C-3	2 meses	Hembra	Sano
4	SM-C-4	1.5 meses	Macho	Sano
5	SM-C-5	1 mes	Macho	Sano
6	SM-C-6	2 meses	Macho	Sano
7	SM-C-7	1.5 meses	Macho	Sano
8	SM-C-8	1.5 meses	Hembra	Sano
9	SM-C-9	1 mes	Macho	Sano
10	SM-C-10	1 mes	Macho	Sano
11	SM-C-11	2 meses	Macho	Sano
12	SM-C-12	1.5 meses	Hembra	Sano
13	SM-C-13	1.5 meses	Macho	Sano
14	SM-C-14	2 meses	Macho	Sano
15	SM-C-15	1 mes	Macho	Sano
16	SM-C-16	1.5 meses	Macho	Sano
17	SM-C-17	2 meses	Macho	Sano
18	SM-C-18	2 meses	Macho	Sano
19	SM-C-19	1 mes	Hembra	Sano
20	SM-C-20	1.5 meses	Hembra	Sano
21	SM-C-21	2 meses	Hembra	Sano
22	SM-C-22	1.5 meses	Macho	Sano
23	SM-C-23	2 meses	Hembra	Sano
24	SM-C-24	1 mes	Macho	Sano
25	SM-C-25	2 meses	Macho	Sano
26	SM-C-26	1.5 meses	Hembra	Sano
27	SM-C-27	1.5 meses	Hembra	Sano
28	SM-C-28	2 meses	Macho	Sano
29	SM-C-29	2 meses	Hembra	Sano
30	SM-C-30	1 mes	Macho	Sano

Número	Código	Edad	Sexo	Condición
31	SM-CE-31	2 meses	Hembra	Enfermo
32	SM-CE-32	1 mes	Macho	Enfermo
33	SM-CE-33	1.5 meses	Macho	Enfermo
34	SM-CE-34	1.5 meses	Macho	Enfermo
35	SM-CE-35	2 meses	Hembra	Enfermo
36	SM-CE-36	1 mes	Macho	Enfermo
37	SM-CE-37	2 meses	Hembra	Enfermo
38	SM-CE-38	1.5 meses	Macho	Enfermo
39	SM-CE-39	1.5 meses	Macho	Enfermo
40	SM-CE-40	1 mes	Macho	Enfermo
41	SM-CE-41	1.5 meses	Macho	Enfermo
42	SM-CE-42	2 meses	Hembra	Enfermo
43	SM-CE-43	1.5 meses	Hembra	Enfermo
44	SM-CE-44	1 mes	Hembra	Enfermo
45	SM-CE-45	2 meses	Macho	Enfermo
46	SM-CE-46	1 mes	Hembra	Enfermo
47	SM-CE-47	1 mes	Macho	Enfermo
48	SM-CE-48	1.5 meses	Macho	Enfermo
49	SM-CE-49	1 mes	Macho	Enfermo
50	SM-CE-50	1.5 meses	Hembra	Enfermo
51	SM-CE-51	2 meses	Macho	Enfermo
52	SM-CE-52	1 mes	Macho	Enfermo
53	SM-CE-53	1 mes	Macho	Enfermo
54	SM-CE-54	1.5 meses	Hembra	Enfermo
55	SM-CE-55	1 mes	Macho	Enfermo
56	SM-CE-56	1 mes	Hembra	Enfermo
57	SM-CE-57	2 meses	Hembra	Enfermo
58	SM-CE-58	1.5 meses	Macho	Enfermo
59	SM-CE-59	1.5 meses	Macho	Enfermo
60	SM-CE-60	2 meses	Macho	Enfermo

Anexo 2. Resultados de los halos de inhibición (mm) y antibiótipos (S, I o R) de cepas de *Escherichia coli* provenientes de heces de crías de alpaca clínicamente sanas. Cepas 1 – 15. S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente.

E.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
Trimetoprim	21 S	23 S	25 S	27 S	24 S	24 S	30 S	28 S	29 S	22 S	28 S	25 S	28 S	22 S	28 S
Enrofloxacin	18 I	15 R	19 R	18 I	28 S	18 S	22 S	20 S	19 I	22 S	13 R	20 I	20 I	16 R	16 R
Fosfomicina	21 S	18 S	15 S	20 S	14 I	30 S	20 S	14 I	18 S	16 S	21 S	18 S	21 S	20 S	21 S
Ciprofloxacino	29 S	23 S	17 S	20 I	26 S	18 S	24 S	30 S	20 S	20 I	20 I	13 R	25 S	31 S	28 S
Gentamicina	20 S	18 S	23 S	20 S	20 S	24 S	20 S	24 S	19 S	22 S	20 S	20 S	22 S	20 S	22 S
Nitrofurantoina	15 R	13 R	11 R	12 R	14 R	14 R	12 R	14 R	R	20 S	14 R	12 R	12 R	14 R	16 R
Ceftioxona	18 I	21 S	23 S	21 S	22 S	30 S	22 S	21 S	20 S	30 I	18 S	21 S	21 S	20 I	25 S
Ceftadizina	18 S	20 S	18 S	20 S	24 S	22 S	20 S	16 I	19 S	22 S	20 S	12 R	21 S	21 S	17 I
Oxitetraciclina	19 S	18 I	15 R	16 R	18 I	20 I	20 S	22 S	16 S	21 I	18 S	15 R	14 R	19 S	19 S
Amikacina	17 S	15 I	12 I	18 R	14 S	18 I	18 S	18 S	19 S	23 S	18 S	10 R	14 I	20 S	18 S

Anexo 3. Resultados de los halos de inhibición (mm) y antibiótipos (S, I o R) de cepas de *Escherichia coli* provenientes de heces de crías de alpaca clínicamente sanas. Cepas 16 – 30. S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente.

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Trimetoprim	24 S	24 S	24 S	30 S	30? S	S	25 S	28 S	24 S	26 S	25 S	12 S	21 R	S 19?	S 31
Enrofloxacin	20 I	22 S	28 S	20 S	I	S	14 S	R	22 S	22 S	26 S	16 S	16 R	18 R	I 19
Fosfomicina	26 S	20 S	20 S	20 S	S	S	26 S	S	22 S	20 S	16 S	16 S	19 S	20 S	S 12 R
Ciprofloxacino	22 S	25 S	22 S	30 S	S	S	30 S	S	20 S	I	17 I	15? S	15 R	19 R	I 20
Gentamicina	28 S	30 S	20 S	26 S	S	S	26? S	S	16 S	S	16 S	12 S	15 S	16 S	S 19
Nitrofurantoina	14 R	16 R	12 R	10 R	R	S	14 I	R	13 R	14 R	14 R	10 R	14 R	14 R	R 13
Ceftriaxona	25 S	25 S	24 S	26 S	S	S	18 S	I	23 S	23 S	20 I	18 I	24 S	22 S	S 10 R
Ceftazidina	22 S		R	20 S	S	S	18 S	S	21 S	21 S	20 S	15 S	23 R	15 R	S 19
Oxitetraciclina	20 S	22 S	20 S	22 S	S	S	18 S	I	20 S	S	17 S	18 I	23 S	21 S	S 22
Amikacina	16 I	20 S	20 S	20 S	S	S	16 I	S	19 S	S	14 I	14 I	15 I	14 I	S 19

Anexo 4. Resultados de los halos de inhibición (mm) y antibiogramas (S, I o R) de cepas de *Escherichia coli* provenientes de heces de crías de alpaca con cuadros diarreicos. Cepas 1 – 15. S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
Trimetoprim	21 S	33 S	24 S	20 S	27 S	21 S	22 S	32 S	25 S	22 S	22 S	22 S	30 S	20 S	24 S
Enrofloxacin	15 R	19 I	20 I	18 I	21 S	30 S	19 S	22 I	19 S	19 I	21 S	21 S	21 S	21 S	22 S
Fosfomicina	15 I	12 R	22 R	18 S	23 S	20 S	22 S	20 S	20 S	17 S	19 S	26 S	18 S	21 S	26 S
Ciprofloxacino	22 S	25 S	31 S	20 S	24 S	32 S	20 S	35 I	22 S	20 I	25 S	25 S	35 S	31 S	25 S
Gentamicina	20 S	28 S	22 S	11 S	26 R	22 S	15 S	30 S	20 S	20 S	20 S	20 S	22 S	22 S	18 S
Nitrofurantoina	14 R	16 R	15 R	11 R	20 R	15 S	15 R	20 R	13 S	12 R	12 R	14 R	14 R	15 R	12 R
Ceftriaxona	20 I	22 S	25 S	19 S	22 I	23 S	19 S	32 I	22 S	21 S	20 S	25 I	29 S	28 S	21 S
Ceftazidima	13 R	20 S	20 S	17 S	23 I	20 S	19 S	25 S	20 S	21 S	17 S	20 S	25 S	18 S	20 S
Oxitetraciclina	18 I	20 S	21 S	18 S	12 I	19 R	15 S	25 R	17 S	15 I	19 R	20 S	20 S	20 S	18 I
Amikacina	18 S	24 S	20 S	17 S	21 S	19 S	18 S	25 S	17 S	19 S	16 S	19 S	15 S	19 S	20 S

Anexo 5. Resultados de los halos de inhibición (mm) y antibiotipos (S, I o R) de cepas de *Escherichia coli* provenientes de heces de crías de alpaca con cuadros diarreicos. Cepas 16 – 30. S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente.

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Trimetoprim	27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
Enrofloxacin	21	S	R	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	S	I
Fosfomicina	15	I	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacino	28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	18	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	S
Nitrofurantoina	15	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	I	R	S
Ceftriaxona	21	S	I	I	I	S	S	I	I	S	I	S	I	I	S
Ceftazidina	19	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S
Oxitetraciclina	17	I	S	I	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S
Amikacina	15	I	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S

Anexo 6. Artículo científico

Rev Inv Vet Perú 2016; 27(2): 381-387
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11651>

Susceptibilidad Antibiótica de Cepas de *Escherichia coli* en Crías de Alpaca con y sin Diarrea

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS IN NEONATAL ALPACAS WITH AND WITHOUT DIARRHOEA

Manuel Barrios-Arpi¹, Siever Morales C.^{2,4}, Eglinton Villacaqui-Ayllon³

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad antibiótica de aislados de *Escherichia coli* en crías de alpaca con y sin diarrea de las comunidades campesinas de la localidad de Lachocc, departamento de Huancavelica, Perú. Se analizaron hisopados rectales de 95 animales con diarrea y de 60 aparentemente sanos de 1 a 2 meses de edad. El 48.4% (46/95) y el 60% (36/60) de las muestras de animales con y sin diarrea fueron positivas al cultivo de *E. coli*. Estos aislados fueron sensibles a la mayoría de los antibacterianos, especialmente trimetoprim (98%), gentamicina (95%) y fosfomicina (88%). La excepción fue la nitrofurantoína, cuyas cepas mostraron una baja susceptibilidad (8.3%).

Palabras clave: *E. coli*, antibiótico, susceptibilidad, alpaca

ABSTRACT

The present study aimed to determine the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates in neonatal alpacas with and without diarrhea in peasant communities in Lachocc, Huancavelica, Peru. Rectal swabs from alpacas with diarrhoea (n=95) and from apparently normal alpacas (n=60) of 1 to 2 months of age were analysed. The results showed that 48.4% (46/95) and 60% (36/60) of samples from animals with and without diarrhea were positive to *E. coli*. The isolates were sensitive to most of the antibiotics, especially trimethoprim (98%), gentamicin (95%) and fosfomycin (88%). The exception was nitrofurantoin, whose strains showed low susceptibility (8.3%).

Key words: *E. coli*, antibiotic, susceptibility, alpaca

¹ Laboratorio de Patología Clínica y Biología Molecular, ² Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

⁴ E-mail: sieverm@hotmail.com

Recibido: 25 de agosto de 2015

Aceptado para publicación: 15 de enero de 2016

INTRODUCCIÓN

La diseminación de resistencia antimicrobiana en bacterias ha surgido en los últimos años como un serio problema, resultando en la creación de programas de vigilancia, tanto en medicina humana como en veterinaria (Cohen, 2000; WHO, 2002; Lanz *et al.*, 2003). El uso indiscriminado de los antimicrobianos para el tratamiento y prevención de enfermedades, así como en la promoción del crecimiento en la crianza de animales de granja permite el desarrollo de bacterias resistentes a los antimicrobianos, resultando en una amenaza para la salud pública (Lanz *et al.*, 2003).

La colibacilosis es una enfermedad de frecuente ocurrencia en crías de alpaca y es causante de elevadas morbilidades y mortalidades durante las primeras semanas de vida (Ameghino, 1990). La enfermedad ocasiona desde cuadros leves como una infección entérica hasta cuadros de septicemia que llevan a la muerte temprana del animal (Ameghino y DeMartini, 1991). Uno de los principales agentes infecciosos causales de estas patologías, sobre todo en neonatos, son cepas patógenas de *Escherichia coli*, que a diferencia de cepas comensales no patógenas, contienen elementos génicos adicionales responsables de su patogenicidad (Dobrint *et al.*, 2003). *E. coli*, bacteria anaerobia facultativa de la flora intestinal normal de animales y humanos, es causante de la colibacilosis o diarrea blanca en camélidos sudamericanos (CSA), y que en condiciones naturales, puede estar asociada con otros agentes patógenos como los rotavirus (Ameghino, 1990; Morales *et al.*, 2007).

E. coli es sensible a muchos antibióticos; sin embargo, algunos de ellos tienen un mayor efecto sobre ciertos patotipos de la bacteria. Dependiendo del tipo de infección, los antimicrobianos sulfatrimetoprim, fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación se recomiendan generalmente para el tratamiento de infecciones causadas

por *E. coli* no STEC (*E. coli* productora de toxina shiga) (Thielman y Guerrant, 1999). El antibiograma por método de difusión en disco es rápido y fácil de realizar, y proporciona una respuesta rápida para la terapia antimicrobiana (Amezcuca *et al.*, 2002; Teale *et al.*, 2002; Hendriksen *et al.*, 2008).

Los mecanismos de resistencia antibiótica en *E. coli* hacia diferentes antibacterianos son múltiples y continuamente descritos. Estos mecanismos se adquieren mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies, facilitada por elementos móviles, tales como los integrones. Esta transferencia permite que los mecanismos se trasladen entre diferentes enteropatógenos y que se diseminen rápidamente a nivel mundial (Mosquito *et al.*, 2011). Asimismo, Iroha *et al.* (2012) demostraron la existencia de cepas multirresistentes de *E. coli*, tanto en animales como en humanos. Sin embargo, existe una relativa escasez de información respecto a la resistencia a los antimicrobianos de la *E. coli* en animales (Iroha *et al.*, 2012). En uno de los pocos estudios en CSA se reporta que el 80 y 25% de cepas de *E. coli* aisladas de crías de alpacas con cuadros diarreicos y casos fatales demostraron resistencia a la neomicina y oxitetraciclina, respectivamente (Luna, 2012).

El objetivo del presente estudio fue determinar la resistencia antibiótica de aislados de *E. coli* en crías de alpaca aparentemente sanas y en otras con cuadros entéricos, abriendo la posibilidad de diseminación poblacional bacteriana entre animales ante un patrón similar de resistencia y susceptibilidad antimicrobiana entre animales enfermos y sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Ejecución

El presente estudio se realizó entre enero y marzo de 2013 en el Centro de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudameri-

canos Lachoc de la Universidad Nacional de Huancavelica (CIDCS Lachoc-UNH), ubicado en la localidad de Lachoc, a 32 km suroeste de la ciudad de Huancavelica. Es una zona andina subtropical, con altitudes que varían entre de 4225 a 4850 msnm.

Recolección de Muestras

Se trabajó con animales pertenecientes a las comunidades campesinas de la Universidad de Huancavelica. El número de muestras fue obtenido basado en el teorema del límite central y en base a ellos se recolectaron muestras fecales mediante hisopados del recto de 155 crías de alpaca Huacaya de 1 a 2 meses de edad. De estos, 95 estaban con diarrea y 60 estaban clínicamente sanos.

Los hisopados fueron preservados en medios de transporte Stuart y trasladados al laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en Lima.

Procesamiento y Análisis de Muestras

Las muestras fueron cultivadas en caldos de enriquecimiento y agar Mc Conkey durante 18 a 24 horas a 37 °C. Las colonias fermentadoras de lactosa (LFC) de cada muestra con la apariencia típica de *E. coli* y colonias rodeadas por zonas claras de hemólisis fueron coloreadas con la tinción Gram; asimismo, se les hizo la identificación bioquímica a través de las pruebas de fermentación de lactosa, producción de glucosa, indol, urea, sulfuro-indol-motilidad (SIM) e H₂S. Fueron incluidas, además, las pruebas bioquímicas de rojo metilo, Vogues-Proskauer, malonato, fenilalanina, gluconato y sorbitol (INS, 2005).

Las pruebas de sensibilidad se realizaron por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Las placas fueron incubadas por 24 h a 37 °C en aerobiosis o anaerobiosis, según la cepa identificada, y se midieron los halos de inhibición de desarrollo, interpretándolos de acuerdo a

las tablas del Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, 2003). La susceptibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos se calificaron como sensible, intermedia o resistente.

Los antibióticos (discos de sensibilidad) utilizados se encuentran agrupados dentro de las familias de beta-lactámicos (fosfomicina), fluoroquinolonas (enrofloxacin, ciprofloxacina), aminoglucósidos (amikacina, gentamicina), tetraciclinas (oxitetraciclina), cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, ceftadizima) y antibióticos asociados (trimetoprim-sulfametoxazol, nitrofurantoina). Estos fueron elegidos por su eficacia, disponibilidad en el mercado y toxicidad. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C.

Análisis Estadístico

En el presente estudio se siguió el criterio para muestras por conglomerados, debido a que en el sistema extensivo de producción de CSA los animales usualmente son agrupados en corrales y pastorean en pequeñas medianas «puntas» distribuidas en una localidad. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para determinar la asociación entre la susceptibilidad antimicrobiana y la condición sanitaria (sano o enfermo).

RESULTADOS

Los resultados de laboratorio indicaron que el 48.4% (46/95) de las muestras de hisopados rectales de crías de alpaca con diarrea y el 60% (36/60) de aquellas sin diarrea fueron positivas al cultivo de *E. coli*.

Los aislados de *E. coli* provenientes de animales enfermos y sanos fueron sensibles a la mayoría de los antibacterianos, con frecuencias de sensibilidad entre 59 a 98%, a excepción de la nitrofurantoina, cuyas cepas mostraron una susceptibilidad de 8.5%. Los

Cuadro 1. Susceptibilidad antibiótica de aislados de *Escherichia coli* en crías de alpaca con y sin diarrea (n= 82) de comunidades campesinas de Huancavelica, Perú

Antibiótico	Sensible (%)	Intermedio (%)	Resistente (%)
Trimetoprim-sulfametoxazol	98.0	-	2.0
Gentamicina	95.0	2.5	2.5
Fosfomicina	88.0	6.0	6.0
Ceftadizina	78.0	11.0	11
Ciprofloxacino	74.0	22.0	4.0
Ceftriaxona	72.0	26.0	2.0
Oxitetraciclina	63.0	28.0	9.0
Amikacina	59.0	29.0	12.0
Enrofloxacin	39.0	50.0	11.0
Nitrofurantoína	8.5	7.3	84.0

Cuadro 2. Susceptibilidad antibiótica de aislados de *Escherichia coli* en crías de alpaca según la ocurrencia de diarrea (enfermas, n=46; sanas, n=36) de comunidades campesinas de Huancavelica, Perú

Antibiótico	Sensible (%)		Intermedio (%)		Resistente (%)	
	Enfermo	Sano	Enfermo	Sano	Enfermo	Sano
Trimetoprim-sulfametoxazol	97.8	97.2	0	0	2.2	2.0
Gentamicina	93.5	97.2	4.3	0	2.2	2.8
Fosfomicina	87.0	88.9	4.3	8.3	8.7	2.8
Ceftadizina	76.0	80.6	13.0	8.3	11.0	11.1
Ceftriaxona	71.7	72.2	28.3	22.2	0	5.6
Ciprofloxacino	84.8 ^a	61.1 ^b	15.2	30.6	0	8.3
Amikacina	65.2	63.9	19.6	28.8	15.2	8.3
Oxitetraciclina	63.0	50.0	28.3	41.7	8.7	8.3
Enrofloxacin	43.5	33.3	52.2	47.2	4.3	19.5
Nitrofurantoína	10.9	5.6	10.9	2.8	78.2	91.6

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia estadística (p<0.05)

antibióticos con mayor sensibilidad (>80%) fueron trimetoprim-sulfametoxazol (98%), gentamicina (95%) y fosfomicina (88%) (Cuadro 1). El análisis estadístico reveló que solo el ciprofloxacino estuvo asociado a la condición sanitaria ($p < 0.05$; Cuadro 2).

DISCUSIÓN

La resistencia antibiótica observada en el presente estudio fue de baja frecuencia. La mayoría de los aislados de *E. coli*, tanto de animales sanos como enfermos, mostraron susceptibilidad a los antibióticos utilizados a excepción de la nitrofurantoína. El nivel de resistencia a este antibiótico coincide con otros estudios donde se utilizaron mayores espectros de antibióticos contra *E. coli* (Sayah *et al.*, 2005; Zahraei y Farashi, 2006). Asimismo, se reporta alta sensibilidad a este antibiótico en pacientes humanos con infecciones del tracto urinario, mas no así en animales de producción (Gales *et al.*, 2002; Fadda *et al.*, 2005).

La alta resistencia a la nitrofurantoína podría explicarse por el reciente uso indiscriminado de esta droga en el campo y por la aplicación de dosis inapropiadas. Esto es sugerente por el patrón de susceptibilidad similar encontrado en ambos grupos, lo cual estaría indicando que tanto la resistencia y susceptibilidad a los antibióticos utilizados en el presente estudio circulan por conjugación genética (De Francesco *et al.*, 2004).

La susceptibilidad antibiótica fue evidenciada de forma similar en animales con y sin diarrea, a excepción del ciprofloxacino. Altos niveles de sensibilidad fueron observados para trimetoprim (98%), gentamicina (95%), fosfomicina (88%), ceftadizima (78%), ciprofloxacino (74%), ceftriaxona (72%), oxitetraciclina (63%) y amikacina (59%), coincidiendo con otros estudios de susceptibilidad antibiótica de cepas de *E. coli* patogénicas y no patogénicas (Luna *et al.*, 2012).

El ciprofloxacino es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas, y fue el único de los antibióticos que demostró diferencias estadísticas en el comportamiento contra *E. coli* entre animales sanos y enfermos. Estudios previos han reportado una alta susceptibilidad al ciprofloxacino en rumiantes (Gupta *et al.*, 2011), así como una alta efectividad bactericida *in vitro* (Chalkley y Koornhof, 1985), por lo que sería uno de los antibióticos recomendados para el tratamiento de diarreas por *E. coli* en rumiantes incluyendo los CSA, conjuntamente con trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, fosfomicina y ceftazidina que obtuvieron mayor perfil de sensibilidad en el estudio.

CONCLUSIONES

- Las cepas de *Escherichia coli* en animales con y sin diarrea evidencian patrones de sensibilidad y resistencia similares, sugiriendo la circulación constante de las cepas entre poblaciones de animales sanos y enfermos.
- La mayoría de cepas aisladas, tanto de alpacas enfermas como sanas, mostraron una alta sensibilidad a los antibióticos en estudio, con excepción de la nitrofurantoína.
- Se encontró asociación significativa entre ciprofloxacino y la condición sanitaria.

LITERATURA CITADA

1. Ameghino E, De Martini J. 1991. Mortalidad de crías de alpacas. Bol Div IVITA Lima. p 71-80.
2. Ameghino E. 1990. Avances sobre investigación en salud animal: camélidos sudamericanos. Bol Div IVITA-UNMSM 23: 1-66.
3. Amezcua R, Friendship RM, Dewey CE, Gyles C, Fairbrother JM. 2002. Presentation of postweaning

- Escherichia coli* diarrhea in Southern Ontario, prevalence of haemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Can J Vet Res* 66: 73-78.
4. **Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. 1966.** Antibiotic susceptibility testing standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.
5. **Chalkley LJ, Koornhof HJ. 1985.** Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 331-342.
6. **Cohen ML. 2000.** Changing patterns of infectious diseases. *Nature* 406: 762-767. doi: 10.1038/35021206
7. **De Francesco K, Cobbold R, Rice D, Besser T, Hancock D. 2004.** Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks. *Vet Microbiol* 98: 55-61. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.10.017
8. **Dobrint U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, et al. 2003.** Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* 185: 1831-1840. doi: 10.1128/JB.185.6.1831-1840.2003
9. **Fadda G, Nicoletti G, Schito GC, Tempera G. 2005.** Antimicrobial susceptibility patterns of contemporary pathogens from uncomplicated urinary tract infection isolated in a multicenter Italian survey: possible impact in guidelines. *J Chemother* 17: 251-257. doi: 10.1179/joc.2005.17.3.251
10. **Gates AC, Sader HS, Jones RN, SENTRY participants group (Latin America). 2002.** Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 44: 289-299. doi: 10.1016/S0732-8893(02)00470-4
11. **Gupta N, Sharda R, Sharma V, Deshpande A, Udaykar A. 2011.** Pathogenicity and antibiogram of *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic cow calves. *Indian J Field Vet* 7(2): 1-4.
12. **Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Jouy E, Butaye P, Franco, A, et al. 2008.** Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002-2004: the ARBAO-II study. *Acta Vet Scand* 50: 19. doi: 10.1186/1751-0147-50-19
13. **[INS] Instituto Nacional de Salud. 2005.** Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Serie de Normas Técnicas N.º 28. Lima: INS. 109 p.
14. **Iroha IR, Okonkwo EC, Nwakaeze EA, Oji EA, Afukwa FN, Nwuzo AC, Ayogu TE. 2012.** Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from animal and human clinical sample. *Global Res J Microbiol* 2(1): 85-89.
15. **Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. 2003.** Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* isolated from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* 91: 73-84. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00263-8
16. **Luna L, Maturrano L, Rivera H, Zanabria V, Rosadio R. 2012.** Genotipificación, evaluación toxigénica *in vitro* y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet Perú* 23: 280-288. doi: 10.15381/rivep.v23i3.910
17. **Morales S, Paredes D, Pezo D. 2007.** Asociación de rotavirus y *Escherichia coli* fimbriada como agentes causales de infecciones entéricas en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet Perú* 18: 150-153. doi: 10.15381/rivep.v18i2.1486

18. Mosquito S, Ruiz J, Bauer J, Ochoa T. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociada a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Pública 28: 648-656.
19. [NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Wayne, PA, USA: NCCLS Document M100-S11.
20. Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller RA. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. Appl Environ Microbiol 71: 1394-1404.
21. Teale CJ, Martin PK, Watkins G. 2002. VLA antimicrobial sensitivity report. UK: Crown. 74 p.
22. Thielman NM, Guerrant RL. 1999. *Escherichia coli*. In: Yu VL, Merigan Jr TC, Barriere SL (eds). Antimicrobial therapy and vaccines. Baltimore, USA: Williams y Wilkins. p 188-200.
23. [WHO] World Health Organization. 2002. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals. Report of a WHO meeting publication WHO/EMC/200/1014. [Internet]. Available in: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64439/1/WHO_EMC_ZOO_97.4.pdf
24. Zahraei T, Farashi S. 2006. Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz province, Iran. Internat J Poultry Sci 5: 677-684.